

Aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Wiestler

Funktionelle Wechselwirkungen in der Kernhülle: Lamin B-Rezeptor und Lamin A

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum

der Fakultät für Biowissenschaften Heidelberg

der Ruprecht-Karls-Universität

zu Heidelberg

vorgelegt von: **Ute Wickert**

aus Göppingen

2011

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2011

Gutachter: Prof. Dr. Harald Herrmann-Lerdon
Prof. Dr. Stephan Frings

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2002 bis September 2005 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg in der Abteilung Zellbiologie (Leiter: Prof. Dr. W. W. Franke) unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Harald Herrmann-Lerdon angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit ausschließlich von mir selbst angefertigt wurde und ich keine anderen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe als die angegebenen.

Heidelberg, den 05.08.2011

Ute Wickert

- Für meine Eltern und für Stefan-

„Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,
den Glauben zum Handeln.“

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1	Publikationen und Präsentationen	III
2	Danksagungen	IV
3	Zusammenfassung	VI
4	Summary	VII
5	Einleitung	1
5.1	Der Zellkern	1
5.2	Die Kernhülle und ihre assoziierten Proteine	1
5.3	Vorkommen der Lamine im Kern und ihre Aufgaben	3
5.4	Die Struktur der Lamine	4
5.5	Modifikationen der Lamine	5
5.6	Kernhüllenproteine in multifunktionalen Komplexen	6
5.7	Der Lamin B-Rezeptor (LBR), seine Interaktionspartner und seine Bedeutung in der Kernhülle	7
5.8	Laminopathien	10
5.9	Funktion und Morphologie der Granulozyten	14
5.10	Die Rolle von LBR bei der Granulopoiese von HL-60 Zellen	15
6	Zielsetzung	18
7	Abkürzungen	20
7.1	Abkürzungen der Einheiten	23
7.2	Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren	23
8	Material und Methoden	24
8.1	Biologisches Material	24
8.2	Expressionsvektoren	30
8.3	Expressionsplasmide	31
8.4	Antikörper	36
8.5	Größenstandards	37
8.6	DNA-Oligonukleotide	38
8.7	Chemikalien, Enzyme und Radioaktivität	43
8.8	„Kits“	43
8.9	Klone aus dem <i>YTH-high-throughput</i> -Ansatz aus Berlin	43
8.10	Medien und Lösungen	45
8.11	Sonstige Verbrauchsmaterialien	49
8.12	Geräte	49

8.13 DNA Techniken	52
8.14 RNA-Methoden	71
8.15 Proteinbiochemische Techniken	77
8.16 Zellkultur Techniken	90
8.17 Hefe Techniken	92
9 Ergebnisse	103
9.1 RNA-Ergebnisse: Gewinnung der gesamt RNA und Herstellung einer cDNA Bibliothek	103
9.2 RT-PCR: Vergleichende Analyse der Genexpression ausgewählter Gene	110
9.3 Analyse der Ergebnisse aus dem YTH-Ansatz	112
9.4 Ergebnisse aus dem GST-vermittelten Interaktionstest	139
10 Diskussion	148
10.1 Einfluss einiger Kernhüllenproteine auf die Kernmorphologie während der Differenzierung der HL60/S4 Zellen	149
10.2 Einfluss zytoplasmatischer Zytoskelettproteine auf die Kernmorphologie während der Differenzierung der HL-60/S4 Zellen	150
10.3 Neue Interaktionspartner für LBR und Lamin A mithilfe von Interaktionsstudien im <i>YTH-Ansatz</i>	151
10.4 Interaktionen für LBR aus der cDNA-Bibliothek aus einer zu Granulozyten differenzierenden promyeloischen Zelllinie	153
10.5 Interaktionspartner für LBR und Lamin A aus der zerebralen cDNA- Bibliothek	157
10.6 Zusammenschau zur Bedeutung der gefundenen Interaktionen im Kontext des Lamin A-Interaktoms	165
11 Literatur	167
12 Anhang	178
12.1 Sequenzen der aus dem <i>YTH-high throughput-Ansatz</i> erhaltenen Klone	178

1 Publikationen und Präsentationen

Wickert, U., N. Mücke, Wedig T, Müller SA, Aebi U, Herrmann H. (2005).

Characterization of the in vitro co-assembly process of the intermediate filament proteins vimentin and desmin: mixed polymers at all stages of assembly.

Eur J Cell Biol 84(2-3): 379-91.

Pegoraro, G., N. Kubben, **Wickert, U.,** Göhler, H., Hoffmann, K., Misteli, T. (2009).

Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex.

Nat Cell Biol 11(10): 1261-7.

SEB Symposium “The Nuclear Envelope: Disease and Chromatin Organization”

(2004), Durham. Poster: U. Wickert H. Herrmann “Investigation of the function of LBR during the differentiation process of HL-60 cells“

5. Nachwuchswissenschaftler-Tagung „Zellkernarchitektur“ 2003, Jena

Kurzvortrag und Poster: “Investigation of the function of LBR during the differentiation process of HL-60 cells“

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) 2003, Bonn:

Poster: U. Wickert H. Herrmann “Investigation of the function of LBR during the differentiation process of HL-60 cells“

1. Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology “Functional Organization of the Nuclear Envelope in Health and Disease” 2004

Poster: U. Wickert H. Herrmann “Investigation of the function of LBR during the differentiation process of HL-60 cells“

6th Young Scientists Meeting (DGZ) 2004, Heidelberg

Poster: U. Wickert H. Herrmann “Investigation of the function of LBR during the differentiation process of HL-60 cells“

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) 2005, Heidelberg:

Poster: U. Wickert H. Herrmann “Investigation of the function of LBR during the differentiation process of HL-60 cells“

DKFZ Doktoranden Posterwettbewerb, 2005

Poster: U. Wickert H. Herrmann “Investigation of the function of LBR during the differentiation process of HL-60 cells“

2 Danksagungen

Prof. Dr. H. Herrmann-Lerdon danke ich, für die Überlassung des spannenden Themas. Darüber hinaus für die motivierende Zusammenarbeit und die stetige Unterstützung. Danken möchte ich Prof. Dr. H. Herrmann-Lerdon auch für die vielen Möglichkeiten zum Austausch mit Wissenschaftskollegen aus dem Netzwerk der Zellbiologie und Kernstruktur Forschung an zahlreichen Kongressen, sowie für die Ermöglichung des Aufenthalts im Labor von Prof. Dr. R. Goldman an der Northwestern Universität in Chicago.

Meinem Zweitgutachter Prof. Dr. S. Frings danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit.

Prof. Dr. Ada Olins und Prof. Dr. Don Olins danke ich für die schöne Zusammenarbeit während der Erstellung der RT-PCR Daten sowie den inspirierenden Gedankenaustausch.

Dr. Daniel Mertens für seine fachkundige Einführung in die Technik der RT-PCR.

Prof. Dr. E. Wanker, Dr. U. Stelzl und Dr. H. Göhler danke ich für die Möglichkeit der Zusammenarbeit für den *YTH-high-throughput-Screen* am Max Delbrück-Centrum in Berlin.

Prof. Dr. Kathrin Hoffmann danke ich für die erfolgreiche Zeit der Zusammenarbeit während der *YTH-high-throughput-Screen* Phase sowie bei der Arbeit am Paper.

Dr. Norbert Mücke danke ich für die gute Zusammenarbeit am „Desmin Vimentin“ Paper.

Prof. Dr. L. Schmitz danke ich für die Überlassung der HIPK2 Klone.

Dr. Gunnar Wrobel danke ich für die Überlassung der mRNA Proben für die RT-PCR.

Dr. Jörg Schlingemann danke ich für seine Unterstützung mit den Agilent Gelen.

Michaela Hergt danke ich für den kompetenten Rat in der Zellkultur.

Stephi Winters danke ich für die Einführung in die 2D-Gelelektrophorese.

Dr. Sandra Kneissel danke ich für die Einführung in die Technik der mRNA-Extraktion.

Michi und Thorsten gilt mein besonderer Dank für das hilfreiche Korrekturlesen meiner Arbeit und die vielen netten Gespräche.

Allen meinen Kollegen danke ich für eine unvergessliche gemeinsame Laborzeit und das tolle Laborklima! Besonders Alex, die mit mir drei Jahre die Laborbank teilte und Tatjana und Michi ebenso allen anderen Laborkollegen: Thorsten, Doro, Stephi, Harald B., Nicole, Moni, Jens, Pavle, Sarika, Blanka, Tanja, Susi, Cathleen, Judit, Wiebke,

Beate, Sandra, Christine, Sarah, Moni B. und Helga. Meinen Laborkollegen danke ich auch für ihre Freundschaft und Unterstützung während der Schreibphase, die mir viel Motivation gab, diese Arbeit neben meiner neuen Tätigkeit als Lehrer zum Abschluss zu bringen.

Meinem Mann Stefan danke ich für seine große Geduld und die stetige Unterstützung, durch die er mir die Promotionszeit in Heidelberg ermöglichte.

3 Zusammenfassung

Die Suche nach neuen Interaktionspartnern für LBR und Lamin A sollte Faktoren ermitteln, durch die sich Veränderungen des Chromatins und der Kernmorphologie erklären lassen, wie sie für die erblichen Krankheiten Pelger-Huët-Kernanomalie und die Progerie (HGPS) beobachtet werden. Mit dem LBR-N-Terminus durchsuchten wir eine „Yeast-Two-Hybrid“-Bibliothek aus einer zu Granulozyten differenzierenden promyeloiden Zelllinie zwei Tage nach Induktion mit Retinsäure. Das Genexpressionsmuster für LBR zeigte zu diesem Zeitpunkt einen deutlichen Anstieg der LBR-Expression, während die Lamin A-mRNA-Menge relativ konstant blieb. Für LBR konnten wir eine bereits beschriebene Interaktion mit HP1 α und HP1 γ bestätigen und für HP1 β neu zeigen. Die Wechselwirkung mit HIPK2, einer an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligten Kinase, konnte für die Interaktion mit der Kinase-inaktiven Mutante und mit der nicht-sumoylierbaren Mutante sowie mit einem N-terminalen und einem C-terminalen Fragment bestätigt werden, nicht jedoch mit der HIPK2 selbst. Einige der gefundenen Faktoren, darunter PCBP1, U2AF und UBE21, können dem Spleißprozess zugeordnet werden.

Für Lamin A, B1, B2 und LBR durchsuchten wir darüber hinaus eine Hefe-Bibliothek, die aus etwa 5000 zerebralen Faktoren zusammengesetzt war. Eine positive Wechselwirkung wurde für LBR und FAC1, einem DNA-bindenden Protein, im Bereich der ersten globulären nucleoplasmatischen Domäne von LBR sowie einem Bereich des C-Terminus gefunden. Mit der C-terminalen Domäne von Lamin A, die den 50 fehlenden Aminosäuren in HGPS Patienten entspricht, wurden 31 Kandidaten gefunden. Eine starke Wechselwirkung von Lamin A wurde mit den nucleären Proteinen RBBP4, TUSC4, TUBA1, PTN1 und CKN1 über einen GST-vermittelten Interaktionstest unter physiologischen Bedingungen ermittelt. Weiterführende Untersuchungen mit RBBP4 zeigten, dass durch die gestörte Interaktion von RBBP4 mit Lamin A in HGPS- und in normalen Zellen vermehrt Schäden in der Chromatin Organisation sowie der DNA hervorgerufen werden. Die Interaktion von Lamin A mit Proteinen des NURD-Komplexes wie RBBP4 scheint für den Alterungsprozess sowohl in HGPS-Zellen als auch in normalen Zellen von Bedeutung zu sein. In dieser Arbeit konnte somit das Netzwerk der Interaktionspartner für Lamin A und LBR erweitert werden und dessen weitreichende Auswirkung auf Prozesse im Kern insbesondere für die Chromatinorganisation gezeigt werden.

4 Summary

The search for new interacting proteins for lamin B-receptor (LBR) and lamin A should reveal protein factors, that explain changes in chromatin organization and nuclear morphology as observed for hereditary diseases such as Pelger-Huët-Anomaly and progeria, i.e. the Hutchison-Gilford-Progeria-Syndrome (HGPS). A LBR-amino-terminal construct was used to screen a “Yeast –Two-Hybrid”-library that was gained from a promyeloid cell line (HL60) in the course of differentiation to granulocytes two days after induction with retinoic acid. At this time the mRNA expression showed an increase of LBR-mRNA whereas the lamin A-mRNA remained mostly unchanged. For LBR we confirmed the published interaction with HP1 α and HP1 γ . Moreover, we could newly show that HP1 β also interacts with LBR. The interaction with HIPK2, a kinase involved in several signal transduction pathways, was confirmed only for the kinase inactive mutant and for the sumoylation-deficient mutant but not with HIPK2 itself. Three interacting proteins were related to the splicing process, among those were the proteins PCBP1, U2AF and UBE21.

For lamin A, B1, B2 and LBR we searched within a yeast-library composed of more than 5000 cerebral factors for specific interactions. A positive interaction for LBR with FAC1, a DNA-binding protein, was confirmed for the first globular domain of LBR and additionally for the C-terminal nucleoplasmatic domain. Furthermore, the carboxy-terminal domain of lamin A, corresponding to the 50 carboxy-terminal amino acids of lamin A that are missing in HGPS patients, we yielded 31 candidates. The interactions for Lamin A with RBBP4, TUSC4, TUBA1, PTN1 and CKN1 were confirmed under physiological conditions by the GST-pulldown method. Further investigations for RBBP4 as a part of the NURD chromatin remodelling complex showed by disturbing the interaction of RBBP4 and lamin A, that damage of chromatin organization and DNA significantly increased in both HGPS cells and normal cells. Thus, the interaction of lamin A with proteins of the NURD-Komplex, such as RBBP4, is involved in ageing related processes in HGPS cells and in normally aged cells. In this work we were able to extend the network of interactions for lamin A and LBR and to show its impact on nuclear processes in particular for chromatin organization.

5 Einleitung

5.1 Der Zellkern

Der Zellkern wurde erstmals 1831 von Antoni van Leeuwenhoek beschrieben. Matthias J. Schleiden und Theodor Schwann ordneten ihm eine Funktion zu und bezeichneten ihn als „Cytoblast“, als Zellbildner (Übersicht bei Franke 1988). Er enthält das Chromatin und damit nahezu die gesamte genetische Information der eukaryotischen Zelle. Der Zellkern ist der Ort der Genexpression, der DNA-Replikation, RNA-Transkription und Prozessierung sowie des Zusammenbaus der Ribosomen. Viele der Prozesse des Kerns finden in sogenannten Kernkörperchen statt. Sie enthalten hohe Konzentrationen bestimmter Kernfaktoren, wodurch die Effizienz der verschiedenen Prozesse erhöht wird. Einer der auffälligsten Kernkörperchen ist der Nucleolus. Hier findet hauptsächlich die rRNA-Synthese durch RNA-Polymerase I sowie der Zusammenbau der Ribosomen aus ihren Untereinheiten statt. Des weiteren findet man unter den Kernkörperchen die Cajal Bodies, Speckles, und PML Bodies (Lamond und Sleeman 2003). Das Genom ist im Zellkern in Form von separaten Einheiten, den Chromosomen, angeordnet. In den Chromosomen liegt die DNA als hoch kompaktiertes Chromatin vor, einem Komplex der aus DNA und Proteinen besteht. Die Chromosomen werden im Nucleoplasma jeweils auf bestimmte Territorien begrenzt vorgefunden. Sie vermischen sich kaum mit den benachbarten Chromosomen. Die stärker kondensierten heterochromatischen Bereiche der Chromosomen befinden sich dabei häufig an der Kernperipherie und rund um die Nucleoli. Die Genexpression des Heterochromatin ist unterdrückt. Das weniger stark kondensierte Euchromatin hingegen ist eher im Kerninneren angesiedelt (Lamond und Sleeman 2003).

5.2 Die Kernhülle und ihre assoziierten Proteine

Durch die Kernhülle wird das Nucleoplasma vom Cytoplasma getrennt Abb.: 1. Sie besteht aus der äußeren und der inneren Kernmembran, an die sich die Lamina anlagert. In beide Membranen ist eine Vielzahl von Membranproteinen eingelagert. Die äußere Kernmembran bildet mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ein Kontinuum. Sie ist mit Ribosomen besetzt und ähnelt in ihrer Proteinzusammensetzung weitgehend dem ER. Innere und äußere Kernmembran

sind im Bereich der Kernporenkomplexe durch die Kernporenmembran miteinander verbunden (Lusk, Blobel et al. 2007). Zwischen den beiden Membranen befindet sich der perinucleäre Zwischenraum. In dieses Membransystem sind die Kernporenkomplexe eingelagert, die selektiv den Austausch von Makromolekülen zwischen Nucleoplasma und Cytoplasma ermöglichen. (Goldberg, Harel et al. 1999, Holmer und Worman 2001, Gruenbaum, Margalit et al. 2005). Das 10-20 nm dicke Netzwerk der Lamina vermittelt über Protein-Protein und Chromatin-Protein-Komplexe einen engen Zusammenhalt zwischen der Kernhülle und dem darunter befindlichen Chromatin. Kernhülle und Lamina sind demnach Teil eines einzigartigen Proteinnetzwerks. Mittels einer Proteomanalyse sind mittlerweile mehr als 60 weitere Proteine der inneren Kernmembran zugeordnet worden (Schirmer, Florens et al. 2003). Zu den Proteinen der inneren Kernmembran gehören zum einen die LEM-Domänen Proteine wie das Lamina-assoziierte Polypeptid 1 und 2 (LAP1 und LAP2) mit seinen verschiedenen Spleicevarianten, sowie Emerin und Man1. Die nucleoplasmatische LEM-Domäne vermittelt über die Bindung an den „*barrier to autointegration factor*“ (BAF) die Bindung an Chromatin. Weitere integrale Proteine der inneren Kernmembran sind der Lamin B-Rezeptor (LBR), die SUN-Domain Proteine Sun-1 bzw. Sun-2 und Nurim. Integrale Proteine der inneren Kernmembran werden zunächst in das ER inseriert, und wandern von dort über die Kernporenmembran in die innere Kernmembran, wo sie durch die Bindung an Chromatin oder an die Kernlamina verankert werden (Powell und Burke 1990, Schirmer und Foisner 2007). Lange Zeit wurde angenommen, die Kernhülle diene hauptsächlich der Stabilisierung der Kernarchitektur unter anderem während des Zerfalls und der Neubildung während der Mitose. Zwischenzeitlich konnte gezeigt werden, dass Kernhüllenproteine wie die Lamine an wichtigen Prozessen im Kern beteiligt sind wie z.B. der Transkription und der DNA Replikation (Cohen, Lee et al. 2001). Ihre Bedeutung zeigt sich nicht zuletzt darin, dass Mutationen dieser Proteine zu einer Reihe humaner Erkrankungen führen, die zusammengefasst als Envelopathien bezeichnet werden. Diese Ergebnisse zeigen, welche Bedeutung der Kernhülle und ihrem zugehörigen Protein-Netzwerk zukommt.

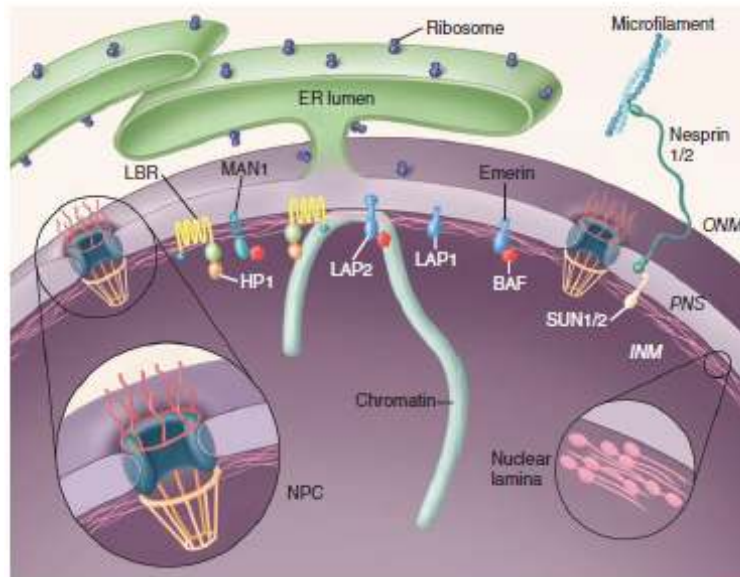


Abb.: 1 Übersicht über die Organisation der Kernhülle. Darstellung einiger ausgewählter Proteine der inneren Kernhülle: Lamina assoziierte Polypeptide 1 und 2 (LAP1 und LAP2) sowie LBR. Diese Proteine interagieren mit HP1 und BAF und vermitteln die Verbindung zu Chromatin. Die Lamin-Filamente bilden die Basisstruktur der Kernlamina. Die Porenmembranen am Rande der Kernporen bilden die Verbindung zwischen innerer und äußerer Kernhülle. Die äußere Kernmembran bildet eine Einheit mit dem ER und wird durch Zytoskelett assoziierte Proteine wie Nesprine gekennzeichnet, die durch Proteine wie Sun-1 und Sun-2 an der inneren Kernmembran verankert sind (Entnommen aus Stewart, Roux et al. 2007).

5.3 Vorkommen der Lamine im Kern und ihre Aufgaben

Das Netzwerk der Kernlamina wird im menschlichen Organismus primär von den Laminen des Typ-A und Typ-B gebildet. B-Typ-Lamine werden von den Genen LMNB1 und LMNB2 kodiert. Sie sind essentiell für den Organismus und werden während der Entwicklung in allen Zellen exprimiert. Die A-Typ Lamine, Lamin A, Lamin C, Lamin A Δ 10 und Lamin C2, entstehen durch alternatives Spleißen aus dem LMNA-Gen und werden gewebespezifisch exprimiert. Durch die Interaktion mit Transmembranproteinen der inneren Kernmembran, wie z.B. dem Lamin B-Rezeptor, Lap1 und Lap2, Emerin und Man1, wird die Lamina an der Kernmembran verankert. Lamine sind jedoch nicht nur Hauptbestandteil der Lamina, sondern werden auch in geringen Konzentrationen im Nukleoplasma gefunden wobei die nukleoplasmatische Fraktion der Lamine eine stärkere Mobilität als die Lamina Fraktion aufweist (Gotzmann und Foisner 1999). So sind sie nicht nur von Bedeutung

für die Aufrechterhaltung der Kernarchitektur sondern sind Teil von Komplexen, die an Aufgaben wie der Genexpression, DNA-Replikation, -Transkription und -Reparatur sowie an der Positionierung des Kerns beteiligt sind (Dahl, Ribeiro et al. 2008, Moir und Spann 2001). Des weiteren konnte in mehreren Studien die Bedeutung der Lamine für Prozesse wie der Chromosomenorganisation und Apoptose gezeigt werden, wodurch die Lamine weit über die rein strukturgebende Funktion hinaus zu multifunktionalen Proteinen werden (Herrmann und Foisner 2003). Während der Mitose sind die A-Typ Lamine löslich und inkorporieren erst nach den B-Typ Laminen in die Kernlamina (Gruenbaum, Margalit et al. 2005). Nach Abschluss der Telophase sowie während der G1 Phase, der infrastrukturellen Reorganisation der Tochterkerne, zeigen die Lamine ein sehr mobiles Verhalten, wohingegen sie zu einem späteren Zeitpunkt nahezu immobil sind (Gruenbaum, Margalit et al. 2005).

5.4 Die Struktur der Lamine

Lamine bilden die Sequenzhomologiekategorie V der Intermediärfilament-Proteine. Sie sind ausschließlich im Kern vorzufinden. Lamine sind evolutionär hoch konserviert besitzen die für die Intermediärfilamente (IF) typische hochkonservierte Domänenstruktur wie sie für das „coiled-coil-Dimer“ in Abb.: 1 dargestellt ist. Dazu gehört die N-terminale globuläre Kopf-Domäne, eine zentrale stabähnliche α -helikale „coiled coil“-Domäne, gefolgt von einer globulären C-terminalen Schwanzdomäne (Herrmann und Foisner 2003; Stuurman, Heins et al. 1998). Die zentrale Stabdomäne kann in mehrere „coiled-coil“-Abschnitte untergliedert werden. Coil1A, Coil1B und Coil2, die jeweils durch eine Linkerdomäne, L1 und L12 bzw. durch einen sogenannten „Stutter“ zwischen Coil2A und Coil2B unterbrochen werden. In der N-terminalen Domäne nahe der Stabdomäne, befindet sich eine Kernlokalisationssequenz (Loewinger und McKeon 1988). Unmittelbar nach der Kernlokalisationssequenz folgt eine globuläre Domäne, die in ihrer Faltung einem „Ig-fold“ ähnelt (Krimm, Ostlund et al. 2002; Dhe-Paganon, Werner et al. 2002). Kopf und Schwanzdomäne sind beide stark positiv geladen, wodurch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder DNA ermöglicht werden (Stierle, Couprie et al. 2003). Anders als die IF-Filamente Desmin und Vimentin, bilden Lamine *in vivo* Homodimere. Es ist unklar, ob sich Filamente aus beiden Lamin Typen bilden

(Wickert, Mücke et al. 2005; Kapinos, Schumacher et al. 2010). Ungleich den anderen Intermediärfilamentproteinen lassen sich die Lamine *in vitro* bisher nur für das Ce-lamin von *C. elegans* zu den 10-nm Filamenten assemblieren (Karabinos, Schunemann et al. 2003). *In vivo* konnte in *Xenopus* Oocyten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen eine netzartige Struktur der Lamina gezeigt werden (Aebi, Cohn et al. 1986). Beim Zusammenbau des Kerns nach der Mitose inkorporieren zunächst die A-Typ Lamine gefolgt von den C-Typ Laminen in ein bestehendes B-Typ-Lamin-Netzwerk (Hutchison, Alvarez-Reyes et al. 2001).

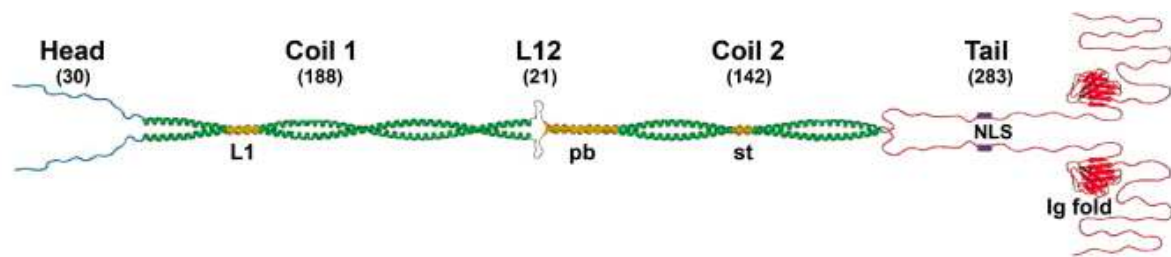


Abb.: 2 Strukturmodell eines Lamin A Dimers. Die zentrale α -helicale rod Domäne (grün), die durch den Linker L12 in coil 1 und coil 2 unterteilt wird, wird von einer nicht α -helicalen amino-terminalen (head-Domäne in blau) und einer carboxyterminalen Domäne (tail, in rot) flankiert. Der stutter (st) in coil 2 unterbricht das kontinuierliche heptaden Pattern. Durch die Nummern unter den Domänen wird die Anzahl der Aminosäuren des Abschnitts dargestellt. Die „Tail“-Domäne enthält das Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie eine konservierte Immunglobuläre Domäne (Ig fold) (Kapinos, Schumacher et al. 2010).

5.5 Modifikationen der Lamine

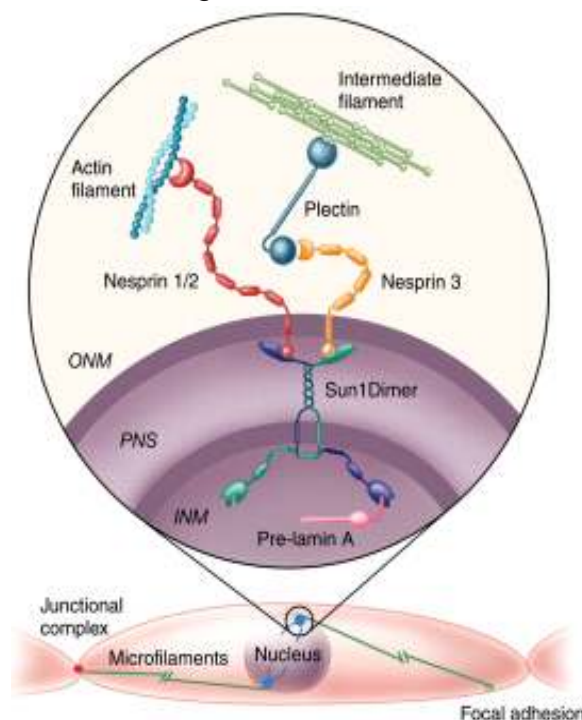
Die Lamine, mit Ausnahme von Lamin C, besitzen eine sogenannte „CaaX-Box“. Für Lamin A entspricht die CaaX-Box den Aminosäuren Cys, Iso, Ser, Met. Die CaaX-Box ist verantwortlich für eine Reihe posttranslationaler Modifikationen. Durch die CaaX-Box Prozessierung wird die Bindungsfähigkeit der Proteine an Membranen verändert, wodurch ihre Lokalisation im Zellkern und damit ihre funktionellen Eigenschaften beeinflusst werden (Gelb et al., 2006). Bei der Prozessierung der A-Typ Lamine wird in einem ersten Schritt Cystein farnesyliert, gefolgt von der Spaltung der -aaX Sequenz mit anschließender Carboxymethylierung des Cysteins (Rusinol und Sinensky 2006). Durch diese Modifikationen wird die Bindungsfähigkeit der Lamine an die innere Kernmembran verändert (Dechat, Shimi et al. 2007; Krohne, Waizenegger et al. 1989). Während die B-Typ Lamine farnesyliert und carboxymethyliert bleiben, durchlaufen die A-Typ Lamine eine Reifung. Das

sogenannte Prelamin A wird durch die Zink Metalloproteinase ZMPSTE24/FACE1 prozessiert, wobei ein Rest von 15 AS mitsamt dem modifizierten Cystein vom C-Terminus entfernt wird (Corrigan, Kuszczak et al. 2005). Auch der Phosphorylierungszustand der Lamine spielt eine wichtige Rolle. Die Lamine enthalten eine große Anzahl potentieller Phosphorylierungsstellen (Serin und Threonin). Zu Beginn der Mitose wird das Netzwerk der Lamine depolymerisiert. Dies geschieht aufgrund der Phosphorylierung durch eine cdc2 Kinase (Heald und McKeon 1990; Nigg 1992; Peter, Heitlinger et al. 1991; Peter, Nakagawa et al. 1990). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Lamin-Dimeren die Bildung von höher organisierten Strukturen verhindern (Peter, Heitlinger et al. 1991; Nigg 1992). Es ist naheliegend, dass auch *in vivo* die Polymerisation durch Phosphorylierung nahe der Stabdomäne beeinflusst wird.

5.6 Kernhüllenproteine in multifunktionalen Komplexen

Die Lamine und das Netzwerk der direkten und indirekten Lamin-Interaktionspartner werden als Lamin-Interaktom bezeichnet. Innerhalb dieses Netzwerks ordnen sich die Proteine zu funktionellen Proteinkomplexen an. Die Proteine des „*linker of the nucleoskeleton to the cytoskeleton*“ (LINC)-Komplex bilden eine Verbindung zwischen dem Karyoskelett und dem Zytoskelett bis hin zur Plasmamembran (Crisp, Liu et al. 2006; Stewart, Roux et al. 2007). Eine wichtige Rolle spielen dabei die Nesprine, eine neue Klasse multifunktionaler Proteine mit „Spectrin-Repeat“-Domänen: Darunter Nesprin-1 (auch bekannt als Syne-1 oder Enaptin), Nesprin-2 (auch bekannt als Syne-2 or NUANCE) und Nesprin-3 und Nesprin-4, (Zhang, Beresford et al. 2001; Wilhelmsen, Litjens et al. 2005; Roux, Crisp et al. 2009). Die Nesprine bilden durch alternatives Spleißen eine große Zahl verschiedener Spleißvarianten, die an unterschiedlichsten Orten der Zelle gefunden werden. Nesprin-1, -2 und -3 sind mit ihrer hochkonservierten KASH-Domäne im perinucleären Raum verankert. Über ihre Aktin-Bindedomäne oder über den N-Terminus selbst stellen sie eine Verbindung zwischen Kernmembran und Zytoskelettproteinen, wie Aktin, Plectin und den Intermediärfilamenten her (Wilhelmsen, Litjens et al. 2005; Roux, Crisp et al. 2009). KASH-Proteine der äußeren Kernmembran interagieren im perinucleären Raum mit den SUN-Proteinen der inneren Kernmembran, SUN-1 und SUN-2, und bilden so eine Brücke zwischen

den beiden Membranen der Kernhülle. SUN-Proteine reichen ins Nucleoplasma und interagieren hier mit der Kernlamina (**Abb.: 3**) (Razafsky und Hodzic, 2009). So bietet der LINC-Komplex durch seine Verbindung zwischen Zytoskelett bis hin zur Extrazellulären Matrix die Möglichkeit der Mechanotransduction von extrazellulären Signalen bis ins Nucleoplasma. Es wird vermutet, dass auf diese Weise extrazelluläre Signale die Positionierung der Kerne, die Chromatinorganisation und selbst die Genexpression beeinflussen könnten (Steward und Roux et al., 2009). Möglicherweise trägt der LINC-Komplex durch seine Verbindung zum Cytoskelett zur Positionierung des Kerns in der Zelle bei. Die Positionierung nimmt Einfluss auf die



Polarisierung der Zellen, auf die Zellteilung, die Zellwanderung und die Ausbildung von speziellen Syncytien wie in der Skelettmuskulatur von Säugern vorgefunden werden. Diese Zusammenhänge geben eine Vorstellung davon, wie genetisch bedingte Defekte in Kernhüllen-assoziierten Proteinen den Ablauf dieser Prozesse stören und so zur Ausbildung von klinischen Symptomen, wie sie bei den Laminopathien beobachtet werden, führen könnten (Stewart, Roux et al. 2007; Starr 2009).

Abb.: 3 Vorschlag für den LINC Komplex in Vertebraten Zellen. INM = innere Kernmembran; ONM = äußere Kernmembran; PNS = Perinukleärer Raum (Entnommen aus: Stewart, Roux et al. 2007).

5.7 Der Lamin B-Rezeptor (LBR), seine Interaktionspartner und seine Bedeutung in der Kernhülle

Der Lamin B-Rezeptor (LBR) wurde erstmals von Worman et al. (1988) als Lamin B-bindendes Protein beschrieben (Worman, Yuan et al. 1988). LBR ist ein integrales Protein der inneren Kernmembran. Das menschliche LBR-Protein umfasst 615 Aminosäuren (AS) und besteht aus zwei Hauptdomänen: Der basischen nukleoplasmatischen Domäne, die AS 1-204 umfasst und einer hydrophoben C-

terminalen Domäne (Worman, Evans et al. 1990). Innerhalb der N-terminalen Domäne sind die ersten 60 Aminosäuren entscheidend für die Bindung an Lamin B, die Aminosäuren 70-100 für die Bindung an DNA. Für die Interaktion mit HP1 α und HP1 γ sind die AS 97-174 verantwortlich. Des weiteren bindet LBR die Histone H3/H4 (Holmer und Worman 2001; Gruenbaum, Margalit et al. 2005). Die C-terminale Domäne reicht von AS 209 – 615 und enthält mutmaßlich acht Transmembrandomänen. Sie weist eine starke Homologie mit Genen der Sterol-Reduktase-Familie auf (**Abb.: 4**).

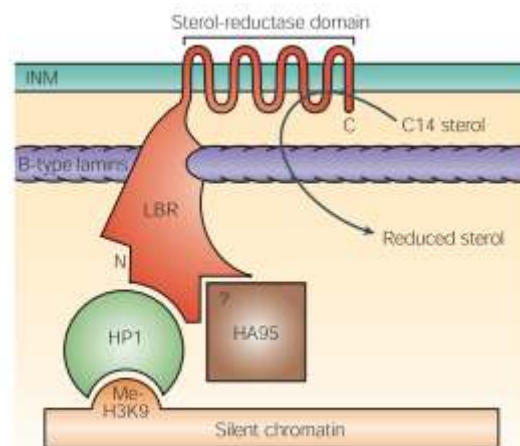


Abb.: 4 LBR ist ein Transmembranprotein der inneren Kernmembran. Die N-terminale Domäne (N) ragt ins Nukleoplasma und interagiert neben Lamin B auch mit Chromatin und chromatin bindenden Proteinen der HP1 Familie. HP1 bindet an stillgelegtes Histon H3 das an Lysin 9 methyliert ist (me)H3K9. LBR bindet auch an HA95. Durch die C-terminale Domäne (C) wird LBR mit acht Transmembrandomänen in der inneren Kernmembran verankert. Sie besitzt Sterolreduktase Aktivität (Gruenbaum, Margalit et al. 2005).

Für den C-Terminus sind bisher keine Interaktionen beschrieben worden. Unklar ist auch, zu welchen Teilen er sich im Nukleoplasma oder im Cytoplasma befindet. Trotz seiner Lokalisation im Kern besitzt LBR kein klassisches Kernlokalisierungssignal, möglicherweise aber ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (Soullam und Worman 1993). Durch Lebendzellbeobachtungen konnte gezeigt werden, dass LBR aus dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Ort seiner Synthese, lateral durch die Membranen der Kernporen diffundiert und hier schließlich durch die Lamina festgehalten wird (Ellenberg, Siggia et al. 1997). Zu den Faktoren, die an der Verankerung beteiligt sind, gehören Lamin B, Proteine der HP1-Familie, DNA, Histone, Chromatin und H95 sowie dem „methyl-CpG binding protein“ (MeCP2)

(Gruenbaum, Margalit et al. 2005 ; Holmer and Worman 2001; Makatsori, Kourmouli et al. 2004 ; Martins, Eide et al. 2000 ; Takano, Takeuchi et al. 2002 ; Ye, Barton et al. 1998). Die Bedeutung von Lamin A/C für die Verankerung von LBR wird kontrovers beschrieben. Laut (Ostlund, Sullivan et al. 2006) ist Lamin A/C nicht entscheidend für die Verankerung von LBR in der Kernhülle. In den Fibroblasten von Emery-Dreifuss Patienten mit der Mutation R377H im LMNA-Gen konnte jedoch eine Umverteilung von LBR aus der inneren Kernhülle ins ER beobachtet werden (Reichart, Klafke et al. 2004). Innerhalb der Vertebraten ist die Proteinsequenz für LBR hoch konserviert. Sequenzvergleiche liefern ~80% Übereinstimmung mit Maus, ~70% mit Huhn, ~50% mit Fröschen und ~50% mit Fischen. Dabei stellt der C-Terminus (~400 AS) den am stärksten konservierten Abschnitt dar. Dieser Abschnitt zeigt eine hohe Sequenzübereinstimmung mit verschiedensten Sterolreduktasen angefangen bei den Hefen bis hin zum Menschen. In Hefestämmen, mit einer reduzierten C14-Sterolreduktase Aktivität konnte durch Transfektion von LBR eine 3 β -hydroxysterol Δ 14-reductase Aktivität nachgewiesen werden (Silve, Dupuy et al. 1998). LBR zeigt 58% Sequenzhomologie zu zwei humanen Sterolreduktasen « *transmembrane 7 superfamily member 2* » (TM7SF2) und « *7-dehydrocholesterol reductase* » (DHCR7), die beide im ER lokalisieren (Ostlund, Sullivan et al. 2006). Zu klären bleibt, ob LBR auch während seiner Lokalisation in der inneren Kernmembran am Sterolabbaumetabolismus beteiligt ist oder nur während der Lokalisation im ER (Bennati, Schiavoni et al. 2008). Der C-terminale Bereich von LBR hat auch eine ~38% Identität mit der Sterol Reduktase der Pflanze Arabidopsis (Schrack, Mayer et al. 2000). Die ~200 AS des N-Terminus hingegen zeigen sehr wenige Sequenzhomologien im übrigen menschlichen Genom (Wagner, Kagermeier et al. 2006). LBR wird durch die RS-Kinase sowie durch die p34^{cdc2} Kinase während der Interphase und auch während der Mitose phosphoryliert (Simos, Maison et al. 1996, Nikolakaki, Meier et al. 1997). Die Phosphorylierung von LBR spielt eine Rolle beim Zerfall und der Neubildung der Kernhülle. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von LBR an Xenopus Spermien Chromatin durch Phosphorylierung mittels verschiedenster Kinasen beeinflusst wird. Hierbei wird die SR reichen Domäne (AS 65-100) der N-terminalen Domäne während der Mitose anders phosphoryliert, als während der Interphase (Takano, Takeuchi et al. 2002; Takano, Koyama et al. 2004).

5.8 Laminopathien

Als Laminopathien werden verschiedene Erbkrankheiten zusammengefasst, die durch Mutationen in Genen, die für Lamine oder Lamin-assoziierte Proteine codieren ausgelöst werden. Davon betroffene Gene sind neben LMNA selbst LBR, Emerin und MAN1 aber auch Lamin prozessierende Proteine wie ZEMPSTE24 (FACE1) (**Abb.: 5**). Allein schon die zur Zeit mehr als 300 verschiedenen bekannten Mutationen in A-Typ-Laminen verursachen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Erbkrankheiten. Die verschiedenen Erkrankungen ähneln sich oft in ihren klinischen Symptomen und Erscheinungsbildern und können aufgrund dessen in vier Gruppen gegliedert werden. Zur ersten Gruppe gehören Erkrankungen, die sich auf das gestreifte Muskelgewebe wie die Skelettmuskulatur und die Herzmuskulatur auswirken. Dazu gehören die autosomal dominante- sowie die rezessive Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD), die autosomal dominante *Limb Girdle Muskeldystrophie* (LGMD) und die *Dilated Cardiomyopathie*. Zur zweiten Gruppe gehören die Lipodystrophy Syndorome, wie die *Dunningan-Typ familial partial Lipodystrophie* (FPLD) sowie die *Mandibuloacrale Dysplasia*. Zur dritten Gruppe, den Neuropathien, gehört die *Charcot-Marie-Tooth* Erkrankung Typ 2B1 (AD-CMT2). Die vierte Gruppe der Erkrankungen wird durch einen beschleunigten Alterungsprozess charakterisiert. Dazu gehören die Hutchison Gilford Progerie (HGPS) und das Werner's Syndrom (**Abb.: 6**) (Broers, Ramaekers et al. 2006; Worman und Courvalin 2005; Worman und Bonne 2007).

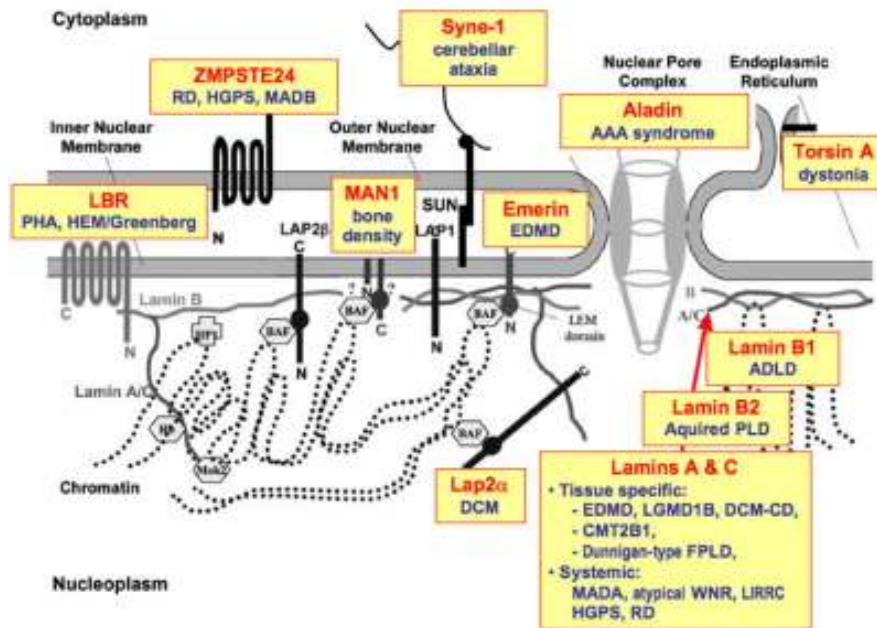


Abb.: 5 Die schematische Darstellung der Kernhülle zeigt die Lokalisation und die Interaktion der verschiedenen Proteine. In den Kästen sind Krankheiten aufgelistet, die durch Mutationen in den Genen hervorgerufen werden, die für die dargestellten Proteine codieren. RD: restrictive dermopathy, HGPS: Hutchinson-Gilford progeria syndrome, PHA: Pelger-Huet anomaly, EDMD: Emery-Dreifuss muscular dystrophy, ADLD: Adult onset autosomal dominant leukodystrophy, BSS: Barraquer-Simons syndrome, LGMD: limb-girdle muscular dystrophy; DCM: dilated cardiomyopathy; CMT: Charcot-Marie-Tooth, FPLD: familial partial lipodystrophy, MADA / MADB: mandibuloacral dysplasia, WNR: Werner syndrome (Worman und Bonne, 2007).

HGPS wird durch eine Mutation im LMNA-Gen hervorgerufen. Hierbei wird eine zusätzliche Spleißstelle eingeführt, wodurch eine Deletion von 50 AS im N-terminalen Bereich des Lamin A Proteins entsteht. Auf diese Weise entfällt ein Teilschritt der posttranslationalen Modifikation von Lamin A. Es entsteht das sogenannte „Progerin“, ein trunkiertes Lamin A mit Franesylrest (De Sandre-Giovannoli, Bernard et al. 2003; Eriksson, Brown et al. 2003). Die Transfektion von Zellen mit einem Progerin Konstrukt führt zu einem progeroiden Phänotyp der Zellen. Progerin lagert sich an der Kernperipherie an und führt zu Veränderungen der Lamina Struktur, lobulierten Kernen und einer Zunahme der DNA-Schäden, sowie dem Verlust von Heterochromatin an der Kernperipherie (Shumaker, Dechat et al. 2006; Scaffidi und Misteli 2008). Progerin wird zu einem gewissen Prozentsatz auch während des physiologischen Alterungsprozesses in Wildtypzellen exprimiert (Scaffidi und Misteli 2006). Ungeklärt bleibt letztlich wie LMNA zwar in fast allen

Zelltypen exprimiert werden kann, jedoch von den unterschiedlichen Mutationen auch ganz unterschiedliche Gewebetypen betroffen sein können und somit völlig unterschiedliche Phänotypen entstehen.

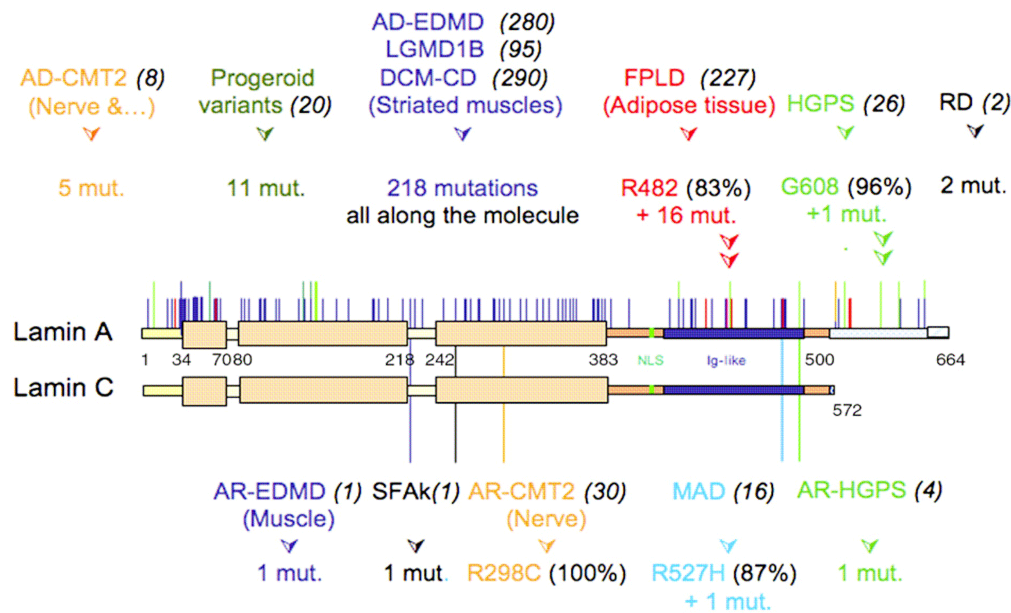


Abb.: 6 Die Darstellung stellt ein Spektrum von Erbkrankheiten dar, die durch Mutationen in LMNA verursacht werden. Die schematische Darstellung zeigt die Proteine Lamin A und Lamin C. Bereiche, deren Mutationen einen bestimmten Erkrankungstyp hervorrufen sind farbig hervorgehoben. In Klammer ist die Anzahl der bisher betroffenen Patienten aufgeführt. Dominante Erkrankungen sind oberhalb der Proteinschemata dargestellt, rezessive unterhalb. Die Abbildung wurde von Broers et al., 2006 adaptiert (Worman und Bonne, 2007).

Die Mutationen in Lamin A sind fast über das ganze Protein verteilt (**Abb.: 6**). Obwohl Art und Position des genetischen Defekts bekannt sind, sind die zellulären Mechanismen, die den Erkrankungen zu Grunde liegen, noch weitgehend ungeklärt. Drei Modelle versuchen Untersuchungsansätze zu liefern, wie die Auswirkungen der Lamin Mutanten zu erklären sind. Das sog. „Strukturmodell“ vermutet, dass Mutationen in Lamin-Proteinen bzw. Lamin-assoziierten Genen Defekte beim Laminassembly und somit in der Laminstruktur verursachen. Das führt zu einer erhöhten Fragilität des Kerns, wodurch auch die Organisation des Kerns beeinträchtigt wird. Das „Genexpressionsmodell“ vermutet, dass Lamin-Komplexe eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Genexpression spielen. Ihre Abwesenheit würde sich demnach dramatisch auf die Genexpression auswirken. Und letztlich das sogenannte „Zell-Schicksals“-Modell, das davon ausgeht, dass Mutationen in

Laminen zu frühzeitiger Apoptose oder Zellalterung führen (Herrmann und Foisner 2003). Mutationen in LBR führen beim Menschen zu zwei Erbkrankheits-Typen, die den Laminopathien zugeordnet werden: Der Pelger-Huët-Anomalie (PHA) und der Greenberg skeletale Dysplasie (HEM) (Hoffmann, Dreger et al. 2002). Die PHA tritt nicht nur beim Menschen auf, sondern kann auch in Hunden (Bowles, Alsaker et al. 1979; Kiss und Komar 1967), Katzen (Latimer, Rakich et al. 1985), und Mäusen (Green, Shultz et al. 1975) identifiziert werden. In Ichthyosis-Mäusen, die einen PHA ähnlichen Phänotyp zeigen, kann das Ichthyosis-Gen ebenfalls auf den Lbr Locus festgelegt werden (Shultz, Lyons et al. 2003). Die Mutationen, durch die PHA hervorgerufen werden, sind in den untersuchten Fällen über das gesamte LBR verteilt. Im heterozygoten Fall zeigt die PHA einen milden Erscheinungstyp mit hypolobulierten Kernen der neutrophilen Granulozyten. Insgesamt konnten nur sehr wenige homozygote Fälle für PHA diagnostiziert werden. In einem Fall lag innerhalb des Intron 12 eine Deletion von 6 bp vor. Hierbei wurde der Spleißprozess von Exon 13 beeinflusst. In den Patientenzellen konnte zwar kein mutiertes Protein gefunden werden, jedoch Spuren des Wildtyp LBR. Somit wurde ein geringer Anteil der mRNA richtig prozessiert. Wie anhand von Blutausstrichen gezeigt werden kann, zeigen die Granulozyten homozygoter Individuen ovoide Zellkerne, die Verteilung des Chromatins erscheint grobkörnig. Zellkerne der heterozygoten Individuen erscheinen stabförmig oder eingebuchtet (**Abb.: 7**). Insgesamt gibt es nur wenige lebende Träger dieser Erbkrankheit

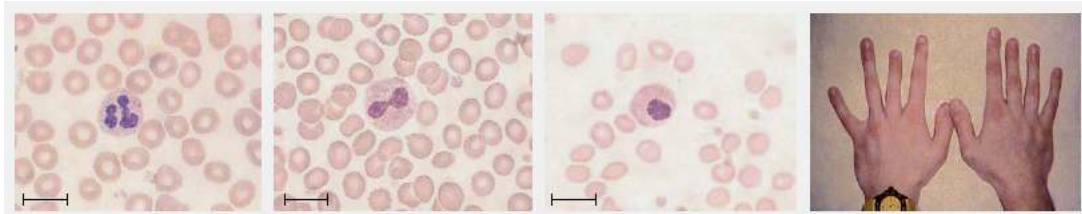


Abb.: 7 a-c) Blutausstriche a) von normalen Neutrophilen mit mehrfach segmentiertem Kern b) ein Neutrophiler der bezüglich der PHA heterozygot ist mit zweilappigem Kern c) ein Neutrophiler der bezüglich PHA homozygot ist mit einem unsegmentierten runden Kern. Messbalken 10 µm. d) Das Individuum 8387 mit einem verkürzten dritten und fünften Metacarpalen in der linken Hand und mit verkürzten dritten und fünften Metacarpalen der rechten Hand (aus Hoffmann, Dreger et al. 2002).

Neben der veränderten Kernmorphologie findet man eine Vielzahl unterschiedlicher klinischer Phänotypen, die von mentaler Retardierung bis hin zu skelettalen Defekten

reichen (Hoffmann, Dreger et al. 2002; Oosterwijk, Mansour et al. 2003). Im entsprechenden Tiermodell wird bei ic/ic Mäusen ein ausgeprägter Phänotyp mit einer erhöhten Sterberate im Mutterleib gefunden. Studien an homozygoten Individuen für PHA und homozygoten Ichthyosis Mäusen machen deutlich, dass eine ausreichende Menge an LBR nötig ist, um in Granulozyten Kernen eine Lobulierung sowie die adäquate Verteilung von Heterochromatin zu erhalten (Shultz, Lyons et al. 2003). Bei der Greenberg/HEM skeletalen Dysplasie handelt es sich um eine Erkrankung, die nicht nur durch Mutationen in LBR hervorgerufen wird, sondern die auch durch den Mangel an 3b-hydroxysterol D14 Reduktase erzeugt werden kann. Die zugehörigen Mutationen werden im C-terminalen Bereich für LBR gefunden. Während die PHA vergleichsweise milde Symptome zeigt, führt die Greenberg/HEM skeletale Dysplasie schon *in utero* zum Tod der Embryonen (Oosterwijk, Mansour et al. 2003).

5.9 Funktion und Morphologie der Granulozyten

Zu den wichtigsten Zelltypen des menschlichen Abwehrsystems gehören die Granulozyten und die Makrophagen. Sie differenzieren aus promyeloiden Vorläuferzellen, die im Knochenmark ihren Ursprung haben. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten überwiegt bei weitem die Zahl der basophilen und eosinophilen Granulozyten. Granulozyten sind in der Lage, aus Blutgefäßen heraus und durch das Gewebe hin zu Entzündungsherden zu wandern, wo sie Bakterien und andere eingedrungene Mikroorganismen töten und phagozytieren. Bemerkenswert ist, dass die Morphologie des Zellkerns der Granulozyten von der für andere Zelltypen charakteristischen ovoiden Form abweicht. Die Kerne zeigen eine deutliche Segmentierung, die auch als Lappung beschrieben wird, wodurch die Wanderungsfähigkeit der Zellen verbessert wird. Durch serielle elektronenmikroskopische Aufnahmen dünner Sektionen durch den Kern eines differenzierten Granulozyten konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um mehrere Einzelkerne handelt. Granulozyten entstammen dem Knochenmark. Die Granulopoiese dauert etwa zwei Wochen. Dabei folgt der mitotischen Phase eine postmitotische Phase während der die Kondensation des Chromatins erfolgt, die mit einer signifikanten Lappung des Kerns einhergeht (Bainton, Ulliyot et al. 1971). Während der zweiwöchigen Reifungsphase entstehen

auch die verschiedenen cytoplasmatischen Granula, die eine Vielzahl von Faktoren unter anderem Bakteriozide enthalten. Normale Neutrophile sterben durch Apoptose mit einer Halbwertszeit von ~7 h, sofern sie nicht auf Entzündungsfaktoren treffen. Des weiteren ist auffällig, dass der Zellkern der Neutrophilen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein Übermaß an peripherem Heterochromatin zeigt. Trotz des hohen Gehalts an Heterochromatin sind die Zellen in der Lage, auf eine Aktivierung durch Entzündungsfaktoren mit einer signifikanten Veränderungen der Genexpression zu antworten (Zhang, Kluger et al. 2004) (Review: Hoffmann, Sperling et al. 2007).

5.10 Die Rolle von LBR bei der Granulopoiese von HL-60 Zellen

HL-60-Zellen eignen sich als *in vitro* Modellorganismus für die Reifung von Granulozyten bzw. Makrophagen. Es handelt sich dabei um eine humane promyeloide leukemische Zelllinie, die in Form von Suspensionszellen leicht in Zellkultur gehalten werden kann. Zur Differenzierung der HL-60-Zellen zu Granulozyten wird der Zellkultur Retinsäure (RA) zugegeben; um Monozyten/Makrophagen zu erhalten wird statt dessen Tetrathorbolester (TPA) verwendet. Mit Hilfe von immunbiochemischen Experimenten, bei denen Antikörper gegen verschiedene Kernhüllenproteine verwendet wurden, konnten die Veränderungen während der Differenzierung in der Kernhüllenzusammensetzung verfolgt werden Abb.: 8 (Olins, Herrmann et al. 2001).

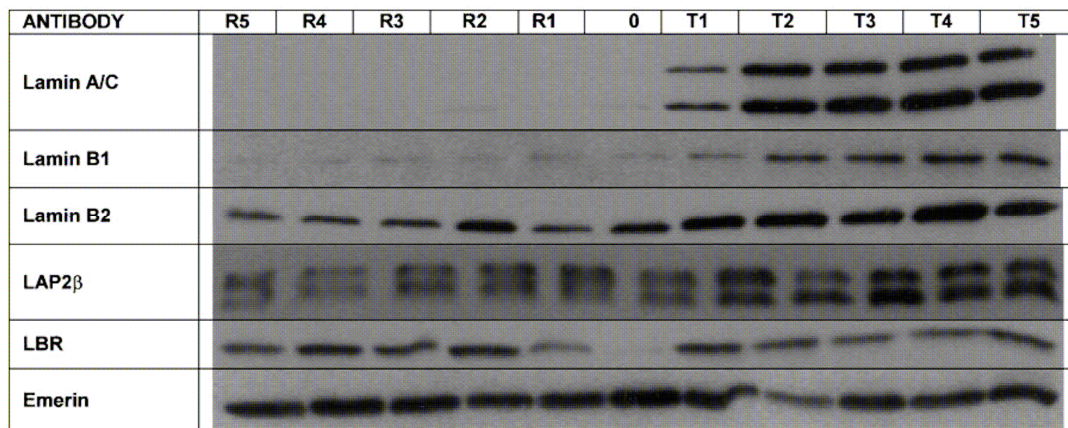


Abb.: 8 Immunoblots von Kernhüllenkomponenten in undifferenzierten, mit RA- bzw. mit TPA behandelten HL-60/S4 Zellen. Gesamtzellextrakte von gleichen Anzahlen wurden in jeder Linie aufgetragen. Die Zellen wurden täglich geerntet: 0, undifferenziert; R1-R5, RA Behandlung für 1-5 Tage; T1-T5, TPA Behandlung für 1-5 Tage. Antikörper gegen Lamin A/C, mAb R27, lamin B1 mAb 119D5F1; lamin B2 mAb x223; LAP2 β , mAb 6G11; LBR, anti-LBR aus Kaninchen; emerin mAb anti-emerin (Olins et al. 2001).

Undifferenzierte HL-60-Zellen sowie auch Granulozyten exprimieren nur wenig Lamin A/C und Lamin B1. In ausgereiften Monocyten hingegen sind die Lamine deutlich angereichert. Ebenso wurde LBR in der undifferenzierten Form nur schwach exprimiert. Eine rasche LBR Zunahme konnte sowohl nach der Gabe von RA als auch von TPA beobachtet werden. Diese Experimente lassen darauf schließen, dass LBR zwar für die Lappung der Kernhülle notwendig ist, dass die Zunahme des LBR Gehaltes allein jedoch nicht ausreicht, um die Lobulierung des Kerns voranzutreiben. Es scheinen weitere Faktoren, wie möglicherweise der Mangel an Lamin A/C und B1 am Wandel der Kernmorphologie beteiligt zu sein. Aber auch bisher noch unbekannte Kernhüllenproteine kommen dafür in Frage. Olins und Olins untersuchten daraufhin den Einfluss der Mikrotubuli auf die Veränderungen der Kernhülle während der Granulopoiese von HL-60 Zellen (Olins und Olins 2004). Durch die Zugabe von Nocodazol, unter dessen Einfluss Mikrotubuli zerstört werden, kann die Lobulierung der Kerne von HL-60 Zellen im Zuge der Differenzierung durch Retinsäure aufgehalten werden. Die Zerstörung des Aktinnetzwerks beeinflusst die Lobulierung nicht. Die Mechanismen, auf denen die Lobulierung basiert, sind damit jedoch noch ungeklärt (Review: Hoffmann, Sperling et al. 2007). Vergleicht man das Vorkommen von LINC Komplex Proteinen in HL-60/S4 Zellen während verschiedener Stadien der Differenzierung, fehlen den

Makrophagen einige der LINC-Komplex-Proteine, die in undifferenzierten Zellen sowie in Granulozyten vorhanden sind. Sie enthalten keine Nesprin-1 oder Nesprin-2 Isoformen sowie kein SUN1, Vimentin, Plectin oder Lamin A/C, wohingegen Actin und SUN2 vorhanden sind (Olins, Hoang et al. 2009). Mittels proteomischer Untersuchungen postulierte Schirmer et al. (2003) mindestens 80 weitere Kernhüllenproteine, deren Interaktionen und Funktion noch nicht genauer beschrieben sind. Wie das PHA bzw. Ichthyosis Modell deutlich gezeigt hat, ist LBR entscheidend an der Veränderung der Kernhüllenmorphologie und der Organisation von Chromatin beteiligt. Man kann davon ausgehen, dass die Lamine und deren assoziierte Proteine wie LBR an weiteren Komplexen an der Kernhülle beteiligt sind. Die Aufklärung dieser Komplexe könnte somit zur Klärung der Fragen beitragen, wie die morphologische Veränderung der Granulozytenkerne und die damit einhergehende Reorganisation von Chromatin im Zusammenspiel mit LBR und Lamin A gesteuert wird.

6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Interaktionspartner für Kernhüllenproteine, insbesondere für den Lamin B-Rezeptor (LBR) und Lamin A, zu finden. Beide Proteine sind für die Veränderung der Kernmorphologie und die Organisation von Chromatin während des Differenzierungsprozesses von Lymphozyten von zentraler Bedeutung. Die neuen Interaktionspartner sollten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Organisation der Kernhülle sowie auf die Heterochromatin-Bereiche des Zellkerns untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte zunächst Wechselwirkungsstudien mittels eines herkömmlichen *Yeast-Two-Hybrid (YTH)*-Screens mit einem Fänger-Konstrukt für den LBR-N-Terminus durchgeführt werden. Darüber hinaus sollten im Rahmen eines *YTH*-Screens aus einer cDNA-Bibliothek, die sich konstitutiv aus zerebralen Faktoren zusammensetzte, Interaktionspartner für Lamin A, Lamin B1 und Lamin B2 gesucht werden.

Zuerst sollte, mittels der RT-PCR Methode das mRNA Expressionsmuster der Kernhüllenproteine Lamin A, Lamin B1, Lamin B2 und LBR sowie der zytoplasmatischen Proteine Vimentin und Aktin während der Retinsäure-abhängigen Differenzierung der promyeloischen Zelllinie HL-60/S4 zu Granulozyten-ähnlichen Zellen untersucht werden. Diese Expressionsmuster sollten mit der biochemisch ermittelten Proteinexpressionsverteilung verglichen werden. Parallel dazu sollten auch die mRNA Expressionsmuster während der Differenzierung zu Makrophagen-ähnlichen Zellen ermittelt werden.

Um eine cDNA-Bibliothek für den *YHT-Screen* herzustellen sollte mittels der RT-PCR der Zeitpunkt für eine signifikant erhöhte mRNA-Synthesen für LBR ermittelt werden. Es wurde angenommen, dass eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des LBR-Gens signifikanter LBR-Anstieg zugleich von einer erhöhten Expression der mit LBR interagierenden Proteine begleitet wird.

Für einen herkömmlichen *YTH-Screen* sollte eine aus differenzierenden HL-60/S4 Zellen hergestellte cDNA-Bibliothek verwendet werden. Parallel dazu sollten mehrere Konstrukte für einen *YTH-high-throughput-Screen-Ansatz* hergestellt werden,

darunter Konstrukte für Lamin A, LBR, Lamin B1 und Lamin B2. Diese Bibliothek setzte sich zu einem großen Teil aus Proteinen zusammen, die im Zentralnervensystem eine besondere Bedeutung haben.

Die in den Hefezellen gefundenen Interaktionen sollten anschließend über die Glutathion-S-Transferase (GST) vermittelten Interaktionstest durch Translation der Proteine in einem Retikulozytenlysatsystem aus Kaninchen verifiziert werden. Somit sollte die Wahrscheinlichkeit einer authentischen Wechselwirkungen erhöht werden.

7 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Amp	Ampzillin
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	engl. Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ECFP	enhanced Cyan Fluorescent Protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-terminal	carboxyterminal
dd H ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
Ds DNA	doppeltständige Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DO	“dropout supplement”
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	engl. verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat- als Natriumsalz
EGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Titriplex®
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FA	Formaldehyd

FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
gp	Guinea pig
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[Ethanschwefelsäure]
HRP	engl. Meerrettich-Peroxidase
hum	human
ICD	Interchromosomales Domänenkompartiment
IF	Intermediärfilament
IMF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Lactose-Analog: <i>isopropyl®-thiogalactosid</i>
Ko-IMF-Färbung	Ko-Immunfluoreszenz-Färbung
Kan	Kanamycin
konz.	konzentriert
Lam	Lamin
LB	„Luria Broth“, Vollmedium für Bakterien
LBR	Lamin B Rezeptor
Li/Ac	Lithium Acetat
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MeAc-Fixierung	Methanol-Aceton Fixierung
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MOPS	Morpholinopropan Sulfonsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal
N-terminal	aminoterminal
NP-40	Nonidet®P40 Substitut
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotide
PB	Probenpuffer
PBS	„Phosphate buffered saline“, Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylen-Glykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin-Gemisch
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Archaeobakterium <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase

rabb.	rabbit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutschen Ressourcen Zentrum für Genomforschung, Berlin
SAP	„Shrimp“ Alkalische Phosphatase
SD-Medium	synthetisches „droupout“ Minimalmedium für Hefen
SD/-3er = SD/-LTH	Minimalmedium für Hefen ohne Leucin, Thryptophan und Histidin
SD/-4er = SD/-	Minimalmedium für Hefen ohne Adenin, Leucin, Thryptophan und
AHLT	Histidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sc	Subklon
Sog.	Sogenannt
ss DNA	einzelsträngige Desoxynukleinsäure
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TB Medium	„Terrific broth“, Vollmedium für Bakterien
TBE	Tris/Borat/EDTA, Laufpuffer für Agarosegelelektrophorese
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
techn.	technische
Tris	N,N,N,-Tris[hydroxymethyl]aminomethan
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ÜB	Überstand
ÜN	Über Nacht
UTR	untranslatierte Region
Vergr.	Vergrößerung
Vim	Vimentin
wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
XL	Xenopus laevis
YPDA	Vollmedium für Hefen mit Adenin angereichert
YTH	Yeast two hybrid
z.B.	zum Beispiel
Ø	Durchmesser

7.1 Abkürzungen der Einheiten

A, mA	Ampere, Milliampere
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
bp, kb	Basenpaare, Kilobasen
Da, kDa, MDa	Dalton, Kilodalton, Megadalton
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Microgramm
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
mol, mmol, µmol, nmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Microliter
M	Molar
U	Unit
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt

7.2 Ein- und Dreibuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8 Material und Methoden

8.1 Biologisches Material

8.1.1 Prokaryotische Zellstämme

Zur Amplifikation und Präparation von Plasmid-DNA dienten folgende *E.coli* Stämme:

- E. coli* sure e14- (McrA-), Δ (mrcCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC:Tn5, (Kan^r), uvrC[F' proAB lac^q Δ M15 Tn10 (Tet^r)] (Stratagene, Heidelberg).
- E. coli* TG-1 supE, hsd Δ 5, thi, Δ (lac-proAB), F'[traD36, pro AB⁺, lac^q, lacZ Δ M15] (Stratagene, Heidelberg).
- DH5 α TM-T1^R F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, M_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (confers resistance to phage T1; Invitrogen, Groningen Niederlande).
- SCS110 rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lac^q Δ M15] (Stratagene, La Jolla, CA).

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurde folgender *E. coli* Stamm verwendet:

- BL21(DE3) *E. coli* B F' dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA).

Die Herstellung von transformationskompetenten *E.coli* sure-Zellen erfolgte, mit leichten Veränderungen, nach der Methode von (Hanahan 1983). Die übrigen Bakterienzellen wurden nach der CaCl₂-Methode (Sambrock et al., 1989) transformationskompetent gemacht.

8.1.2 Kulturzelllinien

Bezeichnung	Ursprung und Eigenschaften	Kulturbedingungen
HL60/S4	Humane promyeloide Leukemiezellelinie, S4 bezeichnet eine Mutante der HL-60 Zelllinie, die aufgrund von Mutagenese besonders sensitiv für die Differenzierung durch Retinsäure war (Mun-Fai Leung <i>et al.</i> , 1992) Suspensionszellen; Retinsäure sensitiv.	RPMI 1640, 10% FKS, 1%Pen/Strep, 5% CO ₂ , 37°C. Teilung bei 1x10 ⁵ Zellen/ml

8.1.3 Hefestämme

Ursprüngliche Hefestämme

Die im Folgenden aufgeführten Hefestämme wurden bei der Durchführung der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode verwendet.

Stamm	Genotyp	Reporter	Transformations-marker	Referenz
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ MEL1	HIS3, ADE2, MEL1, lacZ	Trp1, leu2	Clontech, HD BD Biosciences Holtz, nicht publiziert
Y187	MATα, ura3-52, is3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δmet-, URA2: GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ MEL1	MEL1, lacZ	Trp1, leu2	Clontech, HD BD Biosciences Harper et al., 1993
L40ccua	[MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3, 112 LYS2:: (lexAop) ₄ -HIS3 ura3:: (lexAop) ₈ -lacZ ADE2:: (lexAop) ₈ - URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2]			Wanker et al., 1987
L40cca:	[MATα his3Δ200 trp1-910 leu2-3, 112 ade2 LYS2:: (lexAop) ₄ -HIS3 URA3:: (lexAop) ₈ -lacZ GAL4 gal80 can1 cyh			Wanker et al., 1987

Beide Hefestämme sind Ade-, His-, Leu- und Trp- und können nicht auf Minimalmedium wachsen, da diese Nährstoffe fehlen. Zudem besteht die Möglichkeit, die beiden Stämme miteinander zu verpaaren.

Durch Transformation erzeugte Hefestämme

Bezeichnung	Ursprung	transfiziertes Konstrukt + Vektor	Resistenz + Selektion	Bemerkung
AH109(LBR 1-207)	AH109	LBR 1-207 /pGBKT7	-Trp	„bait“-Konstrukt
AH109(LBR 61-207)	AH109	LBR 61-207 /pGBKT7	-Trp	„bait“-Konstrukt

Bezeichnung	Ursprung	transfiziertes Konstrukt + Vektor	Resistenz + Selektion	Bemerkung
AH109(pGBKT7)	AH109	leerer / pGBKT7	-Trp	Negativkontrolle
AH109(LBR1-207)+pGADT7	AH109	LBR 1-207/ pGBKT7 + pGADT7	-Trp –Leu	Negativkontrolle
AH109(LBR61-207)+pGADT7	AH109	LBR 61-207/ pGBKT7 + pGADT7	-Trp –Leu	Negativkontrolle
AH109(pGBKT7-53)	AH109	Maus p53 / pGBKT7	-Trp	Positivkontrolle
Y187(pTD1-1)	Y187	SV40 T-Antigen/pTD1-1	-Leu	Positivkontrolle
AH109(LBR1-207)+K2.2.1	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K2.2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. -AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K9.1	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K9.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K7.3	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K7.3/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K2.1	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K2.6.1	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K2.6.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K18.2	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K18.2/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K23.1	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K23.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K24.1	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K24.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR1-207)+K15.1	AH 109	LBR1-207 /pGBKT7 K15.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR61-207)+K2.2.1	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K2.2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. -AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR61-207)+K9.1	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K9.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation

Bezeichnung	Ursprung	transfiziertes Konstrukt + Vektor	Resistenz + Selektion	Bemerkung
AH109(LBR61-207)+K7.3	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K7.3/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR61-207)+K2.1	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR61-207)+K2.6.1	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K2.6.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR61-207)+K18.2	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K18.2/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR61-207)+K23.1	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K23.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(LBR61-207)+K24.1	AH 109	LBR61-207 /pGBKT7 K24.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K2.2.1	AH 109	leer /pGBKT7 K2.2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. -AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K9.1	AH 109	leer /pGBKT7 K9.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K7.3	AH 109	leer /pGBKT7 K7.3/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K2.1	AH 109	leer /pGBKT7 K2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K2.6.1	AH 109	leer /pGBKT7 K2.6.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K18.2	AH 109	leer /pGBKT7 K18.2/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K23.1	AH 109	leer /pGBKT7 K23.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K24.1	AH 109	leer /pGBKT7 K24.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7)+K15.1	AH 109	leer /pGBKT7 K15.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –AHLT	Negativkontrolle der Rücktransformation

Bezeichnung	Ursprung	transfiziertes Konstrukt + Vektor	Resistenz + Selektion	Bemerkung
Y187(LBR1-207)+K2.2.1	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K2.2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K9.1	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K9.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K7.3	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K7.3/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K2.1	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K2.6.1	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K2.6.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K18.2	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K18.2/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K23.1	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K23.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K24.1	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K24.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR1-207)+K15.1	Y187	LBR1-207 /pGBKT7 K15.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR61-207)+K2.2.1	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K2.2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR61-207)+K9.1	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K9.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR61-207)+K7.3	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K7.3/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR61-207)+K2.1	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR61-207)+K2.6.1	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K2.6.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187(LBR61-207)+K18.2	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K18.2/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation

Bezeichnung	Ursprung	transfiziertes Konstrukt + Vektor	Resistenz + Selektion	Bemerkung
Y187 (LBR61-207)+K23.1	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K23.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (LBR61-207)+K24.1	Y187	LBR61-207 /pGBKT7 K24.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Rücktransformation
Y187 (pGBKT7) +K2.2.1	Y187	leer /pGBKT7 K2.2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
Y187 (pGBKT7) +K9.1	Y187	leer /pGBKT7 K9.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
Y187 (pGBKT7) +K7.3	Y187	leer /pGBKT7 K7.3/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
AH109(pGBKT7) +K2.1	Y187	leer /pGBKT7 K2.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
Y187(pGBKT7) +K2.6.1	Y187	leer /pGBKT7 K2.6.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
Y187 (pGBKT7) +K18.2	Y187	leer /pGBKT7 K18.2/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
Y187 (pGBKT7) +K23.1	Y187	leer /pGBKT7 K23.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
Y187 (pGBKT7) +K24.1	Y187	leer /pGBKT7 K24.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation
Y187 (pGBKT7) +K15.1	Y187	leer /pGBKT7 K15.1/pGADT7	-Trp –Leu Selkt. –LT	Negativkontrolle der Rücktransformation

Tabelle 1: Durch Transformation in den Hefestamm AH109 bzw. Y187 erzeugte Hefestämme.

Durch Verpaarung erzeugte Hefestämme

Bezeichnung	Ursprung 1	Ursprung 2	Resistenz + Selektion	Bemerkung
AH109(pGBKT7-53) x Y187(pTD1-1)	AH109(pGBKT7-53)	Y187(pTD1-1)	-Trp/-Leu Selekt. -AHLT	Positivkontrolle Diploid

*Tabelle 2: Durch Verpaarung erzeugter Hefestamm. (Erhalten von Dr. A. König.)***8.2 Expressionsvektoren****8.2.1 Expressionsvektoren zur Transfektion von Zellkultur- und Bakterienzellen**

Für die Klonierung von cDNA-Konstrukten, die zur transienten Transfektion von Zellkulturzellen oder zur Transformation von Bakterienzellen verwendet wurden, wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Vektoren eingesetzt.

Plasmidvektor	Größe in bp	Resistenz in Prokaryoten	Resistenz in Eukaryoten	Referenz
pGFP-C1	4700	Kanamycin	Neomycin	Clontech, Heidelberg
pGFP-N1	4700	Kanamycin	Neomycin	Clontech, Heidelberg
pBluescript II KS+	2958	Ampicillin	-	Stratagene
pcDNA 3.1 myc-His	5500	Ampicillin	Neomycin	Invitrogen
pGEX 4T1 (+NcoI)	5000	Ampicillin		Amersham
pEGFP-C1 frame 3	4700	Kanamycin	Neomycin	modifiziert pEGFP-C1 U.Wickert
pOTB7	1815	Chloramphenicol	-	RZPD Heidelberg
pCMV-Sprot6	4396	Ampicillin	-	RZPD Heidelberg
pSPORT1	4109	Ampicillin	-	RZPD Heidelberg
pDNR-LIB	4200	Chloramphenicol	-	RZPD Heidelberg

Tabelle 3: Vektoren, die zur Klonierung von pro- und eukaryotischen Expressionskonstrukten verwendet wurden und deren Eigenschaften.

8.2.2 Expressionsvektoren zur Transfektion von Hefezellen

Plasmidvektor	Größe	Resistenz in Prokaryoten	Wachstumsmarker in <i>S. cerevisiae</i>	Referenz
pGBKT7	7300	Kanamycin	Tryptophan	Clontech, HD BD Biosciences
pGADT7-Rec	8000	Ampicillin	Leucin	Clontech s.o.
pGADT7-53	7300	Kanamycin	Tryptophan	Clontech s.o.
pGTD1-1	10 100	Ampicillin	Leucin	Clontech s.o.
pBTM 117c	9 350	Ampicillin/Kanamycin	-	Wanker et al. 1997
pGAD 426	7 870	Ampicillin	-	Wanker et al. 1997

Tabelle 4: Vektoren, die zur amplifikation in Bakterien und zur Expression Hefestämmen verwendet wurden.

8.3 Expressionsplasmide

8.3.1 Expressionsplasmide zur Transformation von Hefen

Vektor + Konstrukt	Primer	Referenz
pGBKT7 A1 LBR AS 1(+1AS)– 207	(N1LBR/ N2LBR)	
pGBKT7 A4 LBR (AS 61-207)	(N61LBR/ N2LBR)	
pBTM 117c 1 LBR (AS 105 – 210)	(3/4R LBR)	
pGAD 426 1 LBR (AS 105 – 210)	(3/4R LBR)	
pBTM 117c 2 LBR (AS 344 – 385)	(5/6R LBR)	
pGAD 426 2 LBR (AS 344 – 385)	(5/6R LBR)	
pBTM 117c 3 LBR (AS 431 – 493)	(7/8R LBR)	LBR Worman
pGAD 426 3 LBR (AS 431 – 493)	(7/8R LBR)	
pBTM 117c 4 LBR (AS (576)577 – 615)	(9/10R LBR)	
pGAD 426 4 LBR (AS (576)577 – 615)	(9/10R LBR)	
pBTM 117c 7 LBR (AS 1 –105)	(11/2R LBR)	
pGAD 426 7 LBR (AS 1 –105)	(11/2R LBR)	
pBTM 117c 8 LBR (AS 1 –210)	(11/4R LBR)	

Vektor + Konstrukt	Primer	Referenz
pGAD 426 8 LBR (AS 1 –210)	(11/4R LBR)	
pBTM 117c 9 LBR (AS 59 – 150)	(13/14R LBR)	
pGAD 426 9 LBR (AS 59 – 150)	(13/14R LBR)	
pBTM 117c 10 LBR (AS 230 – 326)	(15/16R LBR)	
pGAD 426 10 LBR (AS 230 – 326)	(15/16R LBR)	
pBTM 117c 11 LBR (AS 471 – 550)	(17/18R LBR)	
pGAD 426 11 LBR (AS 471 – 550)	(17/18R LBR)	
pBTM 117c 12 LBR (AS 314- 410)	(19/20R LBR)	
pGAD 426 12 LBR (AS 314- 410)	(19/20R LBR)	
pBTM 117c 13 LMNB2 Head Coil I (AS 1- 230)	(1/2R LMNB2)	
pGAD 426 13 LMNB2 Head Coil I (AS 1- 230)	(1/2R LMNB2)	
pBTM 117c 14 LMNB2 Rod (AS 23- 383)	(3/4R LMNB2)	
pGAD 426 14 LMNB2 Rod (AS 23- 383)	(3/4R LMNB2)	
pBTM 117c 15 LMNB2 Coil II (AS 236- 377)	(5/6R LMNB2)	
pGAD 426 15 LMNB2 Coil II (AS 236- 377)	(5/6R LMNB2)	
pBTM 117c 16 LMNB2 Tail+5Hep (AS 348- 600)	(7/8R LMNB2)	
pGAD 426 16 LMNB2 Tail+5Hep (AS 348- 600)	(7/8R LMNB2)	
pBTM 117c + Seq146 hLA potent. Ig-Fold Domain		Dr. J. Schumacher
pGAD 426 + Seq146 hLA potent. Ig-Fold Domain		Dr. J. Schumacher

Tabelle 5: Expressionsplasmide zur Transformation von Hefezellen.

8.3.2 Expressionsplasmide zur Transformation von Bakterien

Konstrukte	Primer	
pGEX 4T1 (+NcoI) A1 LBR AS 1(+1AS)– 207	AS 1(+1AS)– 207	„prey“ YTH-HD
pGEX 4T1 (+NcoI) A4 LBR (AS 61-207)	(N61 LBR / N2 LBR)	„prey“ YTH-HD
pGEX 4T1 (+NcoI) 1 LBR AS 105 – 210	(3/4R LBR)	„prey“ YTH-Berlin
pGEX 4T1 (+NcoI) 3 LBR (AS 431 – 493)	(7/8R LBR)	„prey“ YTH-Berlin
pGEX 4T1 (+NcoI) 4 LBR AS (576)577 - 615	(9/10R LBR)	„prey“ YTH-Berlin

Konstrukte	Primer	
pGEX 4T1 (+NcoI) 7 LBR AS 1 –105	(11/2R LBR)	„prey“ YTH-Berlin
pGEX 4T1 (+NcoI) 8 LBR (AS 1 –210)	(11/4R LBR)	„prey“ YTH-Berlin
pGEX 4T1 (+NcoI) 9 LBR (AS 59 – 150)	(13/14R LBR)	„prey“ YTH-Berlin
pGEX 4T1 (+NcoI) 16 LMNB2 Tail+5Hep (AS 348- 600)	(7/8R LMNB2)	„prey“ YTH-Berlin
pGEX 4T1 (+NcoI) + Seq146 hLA pot. Ig-Fold Domain		„prey“ YTH-Berlin
pBT IKS+ (CKN1)	CKN1_F /CKN1_RC	YTH-Berlin
pBT IKS+ (PRCBP1)	18_2F /18_2RC	YTH-HD
pBT IKS+ (RNU2)	23_1F / 23_1RC	YTH-HD
pBT IKS+ (SF3A2)	24_1F /24_1RC	YTH-HD
pBT IKS+ vi(PTN)	18B_F /18B_RC	YTH-Berlin
pBT IKS+ (RBBP4)	13 B_F /13B_RC	YTH-Berlin
pBT IKS+ (TUBA3)	14B_F und 14B_RC	YTH-Berlin
pBT IKS+ (TUSC4)	1B_F und 1B_RC	YTH-Berlin

Tabelle 6: Expressionsplasmide zur Transformation von Hefezellen.

8.3.3 Erworbene und erhaltene cDNA-Klone

Über das RZPD erworbene Plasmidexpressionsvektoren

Vektor + Konstrukt	Eigenschaften	Herkunft
pDNR-LIB+CKN1	IMAGp958J211608Q2	RZPD
pSPORT1 + (K17.3)	DKFZp434H064Q	RZPD
pCMV Sport6 + (PRCBP1) K18.2	IMAGp998D2013331Q	RZPD
pOTB7 + (RNU2) K23.1	IMAGp958B08135Q	RZPD
pOTB7 + (SF3A2) K24.1	IMAGp958F2150Q	RZPD
HIPK2 wt	(Hofmann, Moller et al. 2002)	erhalten von L. Schmitz
HIPK2 Δ C	(Hofmann, Moller et al. 2002)	erhalten von L. Schmitz
HIPK2 Δ N	(Hofmann, Moller et al. 2002)	erhalten von L. Schmitz
HIPK2 K25A	(Hofmann, Moller et al. 2002)	erhalten von L. Schmitz
HIPK2 K221A	(Hofmann, Moller et al. 2002)	erhalten von L. Schmitz

Tabelle 7: Erworbene und erhaltene cDNA-Klone.

Über den YTH-high throughput erhaltene Plasmidexpressionsvektoren

Vektor + cDNA-Konstrukt		Interaktion mit
pACT4-1b + MASP1	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + NGFR	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + FALZ	YTH-high-throughput-Berlin	LBR 3 und LBR 4
pACT4-1b + SP110	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + CKN1	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + CDH23	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + CHRNA4	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pGAD428a + APOA1	YTH-high-throughput-Berlin	LBR 16
pACT2+ SMT3H1	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT2+ ECH1	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT2+ UNC119	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT2+ PTN	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT2+ MGC15730	YTH-high-throughput-Berlin	hLA_Cterm (Seq162)

Vektor + cDNA-Konstrukt		Interaktion mit
pACT2+ ZNF145	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT2+ MDS025	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pGAD426+ PHYHIP	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLB1 Seq 169
pGAD426+ C16orf34	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLB1 Seq 169
pACT4-1b + HTF9C	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + PLXNB2	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + GLB1	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + ZFP95	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + PRKCI	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + RBBP4	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + TUBA1	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + MCM3AP	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + ADAMTS10	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + NIPA	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + FLJ14888	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + GNB5	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + ZNF235	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + FBN3	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + TUSC4	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + TRIM46	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)
pACT4-1b + COL4A5	<i>YTH-high-throughput</i> -Berlin	hLA_Cterm (Seq162)

8.3.4 Expressionsplamide zur Transfektion von eukaryotischen Zell-Linien

Konstrukte	Primer	Name des Proteins
pEGFP-C1 frame3 +(CKN1)	CKN1_F /CKN1_RC	Cockayne Syndrome, Type A
pEGFP-N1+(CK N1)	CKN1_F /CKN1_RN	s.o.
pEGFP-C1 frame3 +(PRCBP1)	18_2F /18_2RC	Homo sapiens poly(rC) binding protein 1,

Konstrukte	Primer	Name des Proteins
pEGFP-N1 +(PRCBP1)	18_2F /18_2RC	s.o.
pEGFP-C1 frame3 +(RNU2)	23_1F /23_1RC	Homo sapiens U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2,
pEGFP-N1 +(RNU2)	23_1F /23_1RC	s.o.
pEGFP- C1 frame3 + (SF3A2)	24_1F /24_1RC	Homo sapiens splicing factor 3a, sub-unit 2
pEGFP-N1 + (SF3A2)	24_1F /24_1RC	s.o.
pEGFP- C1 frame3 + vl(PTN)	18B_F /18B_RC	Pleiotrophin
pEGFP-N1 + vl(PTN)	18B_F /18B_RC	s.o.
pEGFP- C1 frame3 + vl(RBBP4)	13B_F /13B_RC	Retinoblastoma-Binding Protein4
pEGFP-N1 + (RBBP4)	13B_F /13B_RC	s.o.
pEGFP- C1 frame3 + (TUBA3)	14B_F und 14B_RC	Tubulin, Alpha –1A
pEGFP- C1 frame3 + (TUSC4)	1B_F und 1B_RC	Tumor Suppressor Candidate 4
pEGFP-N1 + (TUSC4)	1B_F und 1B_RC	
pGEX 4T1 (+NcoI) + Seq146 hLB1 potent. Ig-Fold Domain		Lamin B1

Tabelle 8: Expressionsplasmide zur Transfektion eukaryotischer Zelllinien mit Primern zur Klonierung.

8.4 Antikörper

8.4.1 Primäre Antikörper

Die im Folgenden aufgelisteten Antikörper wurden zur Erstellung dieser Arbeit verwendet.

Antikörper	Antigen	Typ	Ursprung	Immun-lokalisation	Immun-blot	Referenz
HA (3F 10)	HA-Epitop (YPYDVPDYA)	monoklonal	Ratte	1 :200	1 :1000	Roche Diagnostics, Mannheim
α LBR 5-2-10	hum LBR AS 1-209	monoklonal	Rabbit	unverdünnt	1:5	R. Pytela

Antikörper	Antigen	Typ	Ursprung	Immun-lokalisation	Immun-blot	Referenz
HP1 α	HP1 α	monoklonal	Maus Aszites	1:500	1:5000	Euromedex 2HP-2G9-AS
HP1 β	HP1 β	Monoklonal	Maus Aszites	1:500	1:5000	Euromedex, 1MOD-1A9-AS
HP1 γ	HP1 γ	Monoklonal	Maus Aszites	1:500	1:5000	Euromedex 2MOD-1GG-AS
Myc (9E10-2)	c-myc-Epitop	monoklonal	Maus	unverdünnt	1:3	Evan et al., 1985

Tabelle 9: Primärantikörper und ihre Eigenschaften.

8.4.2 Sekundäre Antikörper

Zur Detektion PVDF-membrangebundener Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit Meerettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper aus Ziege verwendet, die gegen Immunglobuline von Maus, Meerschweinchen oder Kaninchen (1:5000) (Dianova, Hamburg) hergestellt worden waren.

8.5 Größenstandards

8.5.1 DNA-Größenstandards

Als Größenstandards für die Agarosegelelektrophorese diente mit EcoRI und HindIII (λ E/H-Marker) verdaute λ -DNA. Der Verdau lieferte die unten aufgelisteten Fragmente.

λ E/H-Marker: 24700, 5148, 4973, 4268, 3480, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 bp.

Wurden kleinere Fragmente nach Verdau der DNA erwartet, so wurde mit Hinfl geschnittene pBluescribe-DNA (BsHinf) als Größenstandard eingesetzt.

BsHinf-Marker: 1400, 517, 396, 356, 247, 75 bp.

8.5.2 Proteingrößenstandards

Als Größenstandard für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente der "Broad Range-7701S"-Marker der Firma New England Biolabs (Bad Schwalbach).

Die Zusammensetzungen ist der angeführten Tabelle zu entnehmen.

Protein	Molekulargewicht (in Da)	Gewebe/Spezies
Myosin	212 000	Kaninchenmuskel
MBP- β -Galaktosidase	158 194	E. coli
β -Galaktosidase	116 351	E. coli
Phosphorylase b	97 184	Kaninchenmuskel
Serum Albumin	66 409	Rind
Gluaminsäure-Dehydrogenase	55 561	Rinderleber
Maltose-bindendes Protein	42 710	E. coli
Laktat-Dehydrogenase M	36 487	Schweinemuskel
Triosephosphat-Isomerase	26 625	Kaninchenmuskel
Trypsin-Inhibitor	20 000	Sojabohne
Lysozym	14 313	Hünereiweiß
Aprotinin	6 517	Rinderlunge
Insulin A-, B-Kette	2340 - 3400	Rinderpankreas

Tabelle 10: Proteinzusammensetzung des "Broad Range-7701S"-Markers.

8.6 DNA-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die für PCR-Amplifikationen, Klonierungsteilschritte und zur DNA-Sequenzierung benutzt wurden, wurden zum Teil von Dr. Wolfgang Weinig (Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) synthetisiert. Weitere Oligonucleotide vor allem für die RT-PCR wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

N 1_LBR	5'GAG AGA CCA TGG GT CCA AGT AGG AAA TTT GCC GAT 3'	Y2H HD
N 2_LBR	5' GAG AGA GGA TCC TTA CTC CAA GTC CTT TGC CCG GAT GGG 3'	Y2H HD
N-61_LBR	5' GAG AGA CCA TGGGT AGG CAA AGG AAA GGT GGC TCA 3'	Y2H HD
2R LBR 105	5' G AGA GAG CGG CCG CTA AAT GTC GGC CTG GTG GGA AGC 3'	Y2H Berlin
3 LBR 105	5' GAGA GAG TCG ACC ATT AAG GAA GCA AGG AGG GAA GTG G 3'	Y2H Berlin
4R LBR 210	5' G AGA GAG CGG CCG CTA TCC TCC AAA CTC CAA GTC C 3'	Y2H Berlin

5 LBR 344	5' G AGA GAG TCG ACC TAC ATG CGC TCT TTG AAA GCG 3'	Y2H Berlin
6R LBR 385	5' G AGA GAG CGG CCG CTA AAA GTA TTT GAG ATC AAA AGT ACC 3'	Y2H Berlin
7 LBR 431	5' G AGA GAG TCG ACG GTG GAT GCT CTC TGG AAT GAG G 3'	Y2H Berlin
8R LBR 493	5' G AGA GAG CGG CCG CTA TTT CAG AAC AAT AAT TAG AGA AGC C 3'	Y2H Berlin
9 LBR 577	5' G AGA GAG TCG ACC ATG TTG CTT GTC CAC CGA GAA GC 3'	Y2H Berlin
10R LBR 615	5' G AGA GAG CGG CCG CTA TTA GTA GAT GTA TGG AAA TAT ACG G 3'	Y2H Berlin
1_LMNB2_HeadCoil_I	5'G AGA GAG TCG ACC ATG GCC ACG CCG CTG CCC GGC 3'	Y2H Berlin
2R_LMNB2_HeadCoil_I	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA CTG CTG CCG GCT GCT GTC CAC CTC C3'	Y2H Berlin
3_LMNB2_Rod	5'G AGA GAG TCG ACG CGG CTG CAG GAG AAG GAG GAG C3'	Y2H Berlin
4R_LMNB2_Rod	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA CAG CCT CTC CTC CTC GCC CTC C 3'	Y2H Berlin
5_LMNB2_Coil_II	5'G AGA GAG TCG ACG ATG GCA CAG GCG CTG GAG GAG C3'	Y2H Berlin
6R_LMNB2_Coil_II	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA CTC CAG GAG CTT CCG GTA GGC3'	Y2H Berlin
7_LMNB2_Tail_5Hep	5'G AGA GAG TCG ACG CAG CAG CAG CTG GCC GAG TAC CAG GAG C3'	Y2H Berlin
8R_LMNB2_Tail_5Hep	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA CAT CAC GTA GCA GCC TCT TGA GGT GG3'	Y2H Berlin
9_LMNB2_Tail	5'G AGA GAG TCG ACG AAG CTG TCC CCC AGC CCA TCC3'	Y2H Berlin
11_LBR_1	5'GAG AGC TCG AGA ATG CCA AGT AGG AAA TTT GCC3'	Y2H Berlin
13_LBR_59	5'GAG AGC TCG AGT TCC TTT AGG CAA AGG AAA GGT GGC3'	Y2H Berlin
14R_LBR_150	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA CTG TGT ATT TTT ATG AGG TGC G3'	Y2H Berlin
15_LBR_230	5' G AGA GAG TCG ACG CTG TTG ATG TGT AAA CAG AAA GAT CCC 3'	Y2H Berlin
16R_LBR_326	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA AAA ATG ACT GTA CAC GTA ATG AAA CTC TAC GCC3'	Y2H Berlin
17_LBR_471	5'G AGA GAG TCG ACC CAA GCC TTT TAT TTA GTC AGT CAT CC3'	Y2H Berlin
18R_LBR_550	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA ACC CAA GTA ATT GGG GTG GCG3'	Y2H Berlin
19_LBR_314	5'G AGA GAG TCG ACC TTC CAG GGC GTA GAG TTT CAT TAC G3'	Y2H Berlin
20R_LBR_411	5'GAG AGA GAG CGG CCG CTA CTG TAT TTT CAT TTC AGC CAA AAG C3'	Y2H Berlin
Desmin 1a	5' C CAG TCC TAC ACC GCC GAG ATT GAC GCC C3'	
Desmin 1b	5' G GGC GTC AAT CTC GGC GGT GTA GGA CTG G 3'	
Desmin 2a	5' AAG ACG GTG ATG ATC AAG ACC ATC GAG 3'	
Desmin 2b	5' G AGA GAA AGC TTA GCA GCT TCC GAG CAC TTC ATG CTG CTG C3'	
Ak 7 (A. König)	5' CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC 3'	pGADT7-Rec Sequenz
Ak 8 (A. König)	5' AGT GAA CTT GCG GGG TTT TTC AGT ATC TAC G 3'	pGADT7-Rec Sequenz
1a LBR	5'CAT ATT GAG AGA AAT GAC GCA CCT 3'	RTPCR
2a LBR	5'ATG TAA CTG CTT TCT TGT GAC AAA CTG 3'	RTPCR

3a LBR	5'TGA AGT GAC CCC CAT CCG 3'	RTPCR
4a LBR	5'CAC AGG CAG GCC AAA CAT G 3'	RTPCR
5a LBR	5'CGT GGT CCC TCC CAT GTG 3'	RTPCR
6a LBR	5'ACA AGC AAC ATG GTG AAA TAA ATT ATG TAG 3'	RTPCR
7a LMNB1	5'GGA GCA GAC TTA CCA TGC CAA 3'	RTPCR
8a LMNB1	5' TGT TGA CAG TAG AAG TAT TCA TCT CTG ATG 3'	RTPCR
9a LMNB1	5' CTT ACA GGA AAC TCT TAG AAG GCG AA 3'	RTPCR
10a LMNB1	5' ACT GTC ACA CGG GAA GAA GGG 3'	RTPCR
11a LMNB1	5' AGC AGC TGG AGT GGT TGT TGA 3'	RTPCR
12a LMNB1	5' AGC TTC TAT TGG ATG CTC TTG G 3'	RTPCR
13a LMNB2	5' GGA GAA CGA CCG GCT CC 3'	RTPCR
14a LMNB2	5' GAC TCG TAC AGC GCC TTG ATG 3'	RTPCR
15a LMNB2	5' CGG CCT CGG GTA GCG T 3'	RTPCR
16a LMNB2	5' CTC CAG TTC CCC AGA GAC TGA T3'	RTPCR
17a LMNB2	5' CGT CCT GGT TAA CGC GGA T 3'	RTPCR
18a LMNB2	5' CCC ATT CTC ATT CTC ACG CAT 3'	RTPCR
19a LMNA	5' AGG GCG AGC TGC ATG ATC T 3'	RTPCR
20a LMNA	5' TGA AGT TGC TTC TTG GCC TCA 3'	RTPCR
21a LMNA	5' AAC AGG CTG CAG ACC ATG AAG 3'	RTPCR
22a LMNA	5' CTC ATG ACG GCG CTT GG 3'	RTPCR
23a LMNA	5' GCT GCG CAA CAA GTC CA 3'	RTPCR
24a LMNA	5' AAG TCA GCA AGG GAT CAT CTC C 3'	RTPCR
25a Vim	5' AGA GAG GAA GCC GAA AAC ACC 3'	RTPCR
26a Vim	5' GTC AAG ACG TGC CAG AGA CG 3'	RTPCR
27a Vim	5' AGT GGA TGC CCT TAA AGG AAC C 3'	RTPCR
28a Vim	5' CAA CGG CAA AGT TCT CTT CCA T 3'	RTPCR
29a Vim	5' TTT TCC TCC CTG AAC CTG AGG 3'	RTPCR
30a Vim	5' TGT CCT TTT TGA GTG GGT ATC AAC 3'	RTPCR
488 GAPDHHfp	5' ATT CCA CCC ATG GCA AAT TC 3'	RTPCR
489 GAPDHHfp	5' TCT CGC TCC TGG AAG ATG GT 3'	RTPCR
490 ACTB3fp	5' GAT CAA GAT CAT TGC TCC TCC TG 3'	RTPCR
491 ACTB3fp	5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC 3'	RTPCR
F1 F	5' CC GGA GGG TCG ACT TTT GCG GCC GCG 3'	pEGFP mod
F1 R oligos	5' GAT CCG CGG CCG CAA AAG TCG ACC CT 3'	pEGFP mod

F2 F	oligos	5' CC GGA GTC GAC TTT TGC GGC CGC G 3'	pEGFP mod
F2 R	oligos	5' GAT CCG CGG CCG CAA AAG TCG ACT 3'	pEGFP mod
F3 Xho F oligos		5' CC GGA GTC GAC TTT CTC GAG G 3'	pEGFP mod
F3 Xho R oligos		5' GA TCC CTC GAG AAA GTC GAC T 3'	pEGFP mod
24_1F		5' AGA GAG GAA TTC GTC GAC ATG GAC TTC CAG CAT CGC CCC 3'	Umklonierung
24_1RC		5' AGA GAG GCG GCC GCT CAGTT GGT TGG GGG AGG GGG AGG TAT G 3'	Umklonierung
24_1RN		5' AGA GAG AC CGG TTG GTT GGT TGG GGG AGG GGG AGG TAT 3'	Umklonierung
13_Y1F		5' GAG AGA CTC GAG TCC GGA ATG CCC TCA GGC AAG GTG GCG 3'	Umklonierung
13_Y1RC		5' AGA GAG GGA TCC TCA GGG CAC CAC AAC GCG GTA GGG 3'	Umklonierung
13_Y1RN		5' AGA GAG ACCGG TTG GGG CAC CAC AAC GCG GTA GGG 3'	Umklonierung
18_2F		5'AGA GAG GAA TTC GTC GAC ATG GAT GCC GGT GTG ACT GAA 3'	Umklonierung
18_2 RC		5' GAG AGA GCGG CCG CTA GCT GCA CCC CAT GCC CTT 3'	Umklonierung
18_2 RN		5'AGA GAG ACC GG TTG GCT GCA CCC CAT GCC CTT CTC 3'	Umklonierung
23_1F		5' GAG AGA GAA TTC TCC GGA ATG TCG GAC TTC GAC GAG TTC 3'	Umklonierung
23_1RC		5' AGA GAG GGA TCC CTA CCA GAA GTC CCG GCG GTG ATA AGA 3'	Umklonierung
23_1RN		5' GAG AGA ACC GGT ACC CAG AAG TCC CGG CGG TGA TAA GA 3'	Umklonierung
6_3F		5' AGA GAG GAA TTC TCC GGA ATG GAG ACA TTC CCT GCA GTG GCT 3'	Umklonierung
6_3RC		5' GAG AGA GGA TCC TCA GCC CAC CTG GGC CCA CGT GTG 3'	Umklonierung
6_3RN		5' GAG AGA ACC GGT GGG CCC ACC TGG GCC CAC GT G 3'	Umklonierung
17_3F		5' GAG AGA GAA TTC TCC GGA ATG GCC ATG ATG GTG TTT CCG 3'	Umklonierung
17_3RC		5' GAG AGA GGA TCC TTA GCC CAC CAG GGA GCT TCG TCG 3'	Umklonierung
17_3RN		5' AGA GAG ACC GGT AA GCC CAC CAG GGA GCT TCG TCG 3'	Umklonierung
CKN1_F		5'GAG AGA GAA TTC GTC GAG ATG CTG GGG TTT TTG TCC GCA C 3'	Umklonierung
CKN1_RC		5'GAG AGA GC GGCC GC TCA TCC TTC TTC ATC ACT GCT G 3'	Umklonierung
CKN1_RN		5'GAG AGA AC CGG TGA TCC TTC TTC ATC ACT GCT GCT CCA 3'	Umklonierung
1B_F		5'GAG AGA GAA TTC TCC GGA ATG GGC AGC GGC TGC CGC 3'	Umklonierung
1B_RC		5'GAG AGA GGA TCC TCA CTT CCA GCA GAT GAT GAT GTT GGG 3'	Umklonierung
1B_RN		5'GAG AGA ACC GG TGA CTT CCA GCA GAT GAT GAT GTT GGG 3'	Umklonierung
16B_F		5' GAG AGA GAATTC GTC GAG ATG GAT CCT GGG GAC GAC TGG C 3'	Umklonierung
16B_RN		5'GAG AGA AC CGG TGA GCG GGG GGC ACA AAG GTC CAC CCA 3'	Umklonierung
21B_F		5'GAG AGA GAA TTC TTC GGA ATG TCC GAG GAG AAG CCC AAG G 3'	Umklonierung
21B_RC		5'GAG AGA GGA TCC CTA GAA ACT GTG CCC TGC CAG GCT GCT 3'	Umklonierung
21B_RN		5'GAG AGA AC CGG TGA GAA ACT GTG CCC TGC CAG GCT GC 3'	Umklonierung
18B_F		5'GAG AGA GAA TTC TTC GGA ATG CAG GCT CAA CAG TAC CAG C 3'	Umklonierung

18B_RC	5'GAG AGA GGATCC TTA ATC CAG CAT CTT CTC CTG TTT CTT GC 3'	Umklonierung
18B_RN	5'AGA GAG ACCGG TGA ATC CAG CAT CTT CTC CTG TTT CTT GCC 3'	Umklonierung
14B_F	5'GAG AGA CTC GAG TCC GGA ATG CGT GAG TGC ATC TCC 3'	Umklonierung
14B_RC	5'GAG AGA GGATCC TTA GTA TTC CTC TCC TTC TTC CTC ACC 3'	Umklonierung
14B_RN	5'GAG AGA AC CGG TGA GTA TTC CTC TCC TTC TTC CTC ACC 3'	Umklonierung
13_BF	5'GAG AGA GAATTC GTC GAG ATG GCC GAC AAG GAA GCA GCC TTC GAC GAC GCA G 3'	Umklonierung
13_BRC	5'GAG AGA GC GGCC GC CTA GGA CCC TTG TCC TTC TGG ATC CAC GCT TCC TTC 3'	Umklonierung
13_BRN	5'GAG AGA AC CGG TGA GGA CCC TTG TCC TTC TGG ATC CAC GCT TCC TTC 3'	Umklonierung
HIPK1 FC	5' GAG AGA GAA TTC TCC GGA ATG GCC CCC GTG TAC GAA G 3'	Umklonierung
HIPK1 FN	5' GAG AGA CTC GAG ATG GCC CCC GTG TAC GAA GGT 3'	Umklonierung
HIPK1 RC	5' GAG AGA GTC GAC TTA TAT GTA AGG GTA CTG GTT GAC CTT GGC 3'	Umklonierung
HIPK1 RN	5' GAG AGA TC CGG AGA TAT GTA AGG GTA CTG GTT GAC CTT GGC 3'	Umklonierung
16B_RC	5' GAG AGA GC GGCCGC TCA GCG GGG GGC ACA AAG G 3'	Umklonierung
15_1_FC	5' GAG AGA GAA TTC TCC GGA ATG TCG GGG ATC GCC CTC AGC 3'	Umklonierung
15_1_RC	5' GAG AGA GGA TCC TTA TGA GGG CGC AAA CTT CTT GGC 3'	Umklonierung
15_1_RN	5' GAG AGA ACC GGT GAT GAG GGC GCA AAC TTC TTG GC 3'	Umklonierung
FALZ_F	5' GAG AGA GAA TTC TGT AGG GTT TGT CAC AAA CTT GGG 3'	Umklonierung
FALZ R	5' GAG AGA CTC GAG TTA GGA CTG GTC TTC AAA TTC TTC 3'	Umklonierung
FALZ AB_F	5' GAG AGA GCC ATG GGA TCC ATG CAT TGT AGG GTT TGT CAC AAA CTT GGG 3'	Umklonierung
FALZ AB_R	5' GAG AGA CTC GAG TTA GGG ACT GGT CTT CAA ATT CTT CAA ATT CTT CTC3'	Umklonierung
HIPK_AS1_F	5' GAG AGA GAA TTC ATG GCC CCC GTG TAC GAA GG 3'	Umklonierung
HIPK_AS200_R	5' GAG AGA GTC GAC TTA CTC GTA GGT GTT GGT CAT GG 3'	Umklonierung
HIPK_AS525_F	5' GAG AGA GAA TTC ATG CCC TTT GTC ACC ATG ACA CAC 3'	Umklonierung
HIPK_AS840_F	5' GAG AGA GAA TTC ATG CCC CGC TGT GCC ATG GTG C 3'	Umklonierung
HIPK_AS935_F	5' GAG AGA GAA TTC ATG CCC TAC TCC GTG CAG CAG C 3'	Umklonierung
HIPK_AS980_F	5' GAG AGA GAA TTC ATG TTG GTG GAG TGT GAT AGC C 3'	Umklonierung
HIPK_AS1049_R	5' GAG AGA GTC GAC TTA CGT GGT GAT GTG CTG CTG AGC C 3'	Umklonierung
HIPK_AS1191_R	5' GAG AGA GTC GAC TTA TAT GTA AGG GTA CTG GTT GAC C 3'	Umklonierung

Tabelle 11: Primer, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

8.7 Chemikalien, Enzyme und Radioaktivität

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in Analysequalität von den folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), und Qiagen (Hilden).

Die eingesetzten Enzyme stammten von den Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Bad Schwalbach).

Die ^{35}S -markierten Aminosäuren Methionin und Cystein wurden als „redivue Promixl“ 1x 2,5 mCi bei Amersham Biosciences, Freiburg bestellt.

8.8 „Kits“

ECL Kit	NEN, Dreieich
Fugene6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Quiaex Agarose Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep / Maxiprep Kit	Quiagen, Hilden
Quaquick PCR-Purification Kit	Quiagen, Hilden
GST Bind Buffer Kit	Novagen, Merck Darmstadt
TNT coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
Canine Pancreatic Microsomal Membranes	Promega, Mannheim
SYBR Green PCR Core Reagents	PE Applied Biosystems, Foster City, CA
Cooled RNA 6000 nano reagents	Agilent Technologies, Waldbronn (5065-4475)
RNA 6000 nano LabChip kit	Agilent Technologies, Waldbronn (5065-4476)
GeneAmp RNA PCR Kit Nr. N808-0143	Applied Biosystems, Foster City, CA

Tabelle 12: Verwendete „Kit“- Systeme.

8.9 Klone aus dem YTH-high-throughput-Ansatz aus Berlin

MPS323g14.p1.abi_1	TUSC4
MPS320n12.p1.abi_1	ZFP95
MPS320n18.p1.abi_1	PRKCI
MPS320f05.p1.abi_1	GLB1
MPS321c17.p1.abi_1	ADAMTS10

MPS321n23.p1.abi_1	ZNF235
MPS321b01.p1.abi_1	RBBP4
MPS321c09.p1.abi_1	MCM3AP NM_003906
410a_“prey“	PTN NM_002825
116a_“prey“	ECH1 BC_01179
470b_“prey“	MGC15730 BC_007618
MPS320d06.p1.abi_1	HTF9C BC_017184
ET_479	HTF9C BC_017184
ET_479	CDH23 Keine DNA
ET_158	MASP1 Keine DNA
ET_192	NGFR Keine DNA
MPS323l09.p1.abi_1	COL4A5 BC_023556
ET_295	SP110 Keine DNA
MPS321i09.p1.abi_1	NIPA NM_016478 / AJ_537494
MPS321o10.p1.abi_1	FBN3 NM_032447
MPS321b06.p1.abi_1	TUBA3 NM_006009
MPS321k18.p1.abi_1	FLJ14888 NM_032856
189a_“prey“	SMT3H1 BC_000036
361b_“prey“	UNC119 NM_054035
299b_“prey“	ZNF145 BC_029812
MPS320d19.p1.abi_1	PLXNB2 BT_006887
MPS321m07.p1.abi_1	GNB5 Keine cDNA
380b_“prey“	MDS025 Keine DNA
MPS320l21.p1.abi_1	similar FLJ00312XM_378228
MPS323g24.p1.abi_1	TRIM46 NM_025058
ET_82	CHRNA4 Keine cDNA

ET_47	CKN1 Keine cDNA
-------	-----------------

Tabelle 13: cDNA-Klone aus dem YTH-high-throughput-Ansatz Berlin. Sequenzen sind im Anhang Tabelle 41 zu finden.

8.10 Medien und Lösungen

Im folgenden sind häufig benutzte Medien und Lösungen beschrieben, auf die im Methodenteil nicht mehr gesondert eingegangen wird. Hier nicht beschriebene Lösungen und Puffer werden methodenabhängig aufgeführt.

8.10.1 Nährmedien

Bakterienmedien

LB-Medium (pH-7,5):	1 l	
	20,0 g	LB Broth Base
		MgSO ₄ x 7 H ₂ O
LB-Medium (pH-7,5) mit Ampicillin oder Kanamycin:		LB-Medium
	100 µg/ ml	Ampicillin oder Kanamycin
LB-Agarplatten mit Ampicillin:	1 l	
	32,0 g	LB Agar
	2,46 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
TB-Medium:	1 l	
	12,0 g	Bacto Trypton
	24,0 g	Bacto Yeast Extrakt
	4,0 ml	Glycerol (87%)
	100 ml	K-Mix
K-Mix:	1 l	
	0,17 M	KH ₂ PO ₄
	0,72 M	KH ₂ PO ₄ wasserfrei

Hefemedien

YPDA-Medium:	1 l	
	50 g	YPD-Medium
	15 ml	0,2 % Adenin-Hemisulfat (erst nach dem Autoklavieren zugeben)

YPDA-Agar (pH 6,5):	1 l	
	70 g	YPD-Agar
	15 ml	0,2 % Adenin-Hemisulfat (erst nach dem Autoklavieren zugeben)
SD-Minimalmedium (pH 5,8):	1 l	
	26,7 g	Do (-AHLT) / Do (-LTH)
	8,3 ml	steril filtrierte Aminosäuren (erst nach dem Autoklavieren zugeben)
SD-Minimalagar (pH 5,8):	1 l	
	46,7 g	SD-Minimalagar
	0,6 g / 0,62 g	Do (-AHLT) / Do (-LTH)
	8,3 ml	steril filtrierte Aminosäuren (erst nach dem Autoklavieren zugeben)

Die Hefenährmedien wurden alle von der Firma Clontech, BD Biosciences, Heidelberg bezogen.

8.10.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

10 x TBE (pH 8,0):	2 l	
	242,8 g	Tris-HCl
	120 g	Borsäure konz.
	18,6 g	EDTA (pH 8,0)
6 x DNA-Probenpuffer:	200 mM	EDTA
	100 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,01 %	Bromphenolblau
	0,01 %	Xylencyanol
	30 %	Ficoll (Typ 400)
PBS (pH 7,4):	2,7 mM	KCl
	1,7 mM	KH_2PO_4
	137 mM	NaCl
	10 mM	Na_2HPO_4

TE:	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA
Kornberg-Elektrophorese-Puffer (pH 8,3):	50 mM	Tris-HCl
	0,38 M	Glycin
	0,1 %	SDS
2x Kornberg-Probenpuffer:	120 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	20 %	Glycerin
	10 %	SDS
	20 %	β-Mercaptoethanol
	0,2 %	Bromphenolblau
2x Kornberg Harnstoff-Probenpuffer:	600 mg	Harnstoff
	600 µl	dd H ₂ O
	500 µl	2x Kornberg-Probenpuffer
Kornberg-Puffer A:	100 ml	
	30 g	Acrylamid
	0,15 g	N,N'-Methylen-bis-acrylamid

Den Puffer für 1 h mit Ionenaustauscher rühren lassen. Lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren. Nicht autoklavieren.

Kornberg-Puffer B (pH 8,8):	3 M	Tris-HCl
	0,4 %	SDS

Kornberg-Puffer C (pH 6,8):	0,75 M	Tris-HCl
	0,4 %	SDS

Die Kornberg-Puffer B und C wurden am Vortag angesetzt. Am nächsten Tag wurden der pH-Wert nochmals korrigiert. Die Puffer wurden nicht autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Zusammensetzung der Kornberg Proteingels 15%

Trenngel		Sammelgel	
Kornberg-Puffer A	7,5 ml	Laemmli-Puffer A	1,3 ml
Kornberg-Puffer B	3,75 ml	Kornberg-Puffer C	2,5 ml

dd H ₂ O	3,65 ml	dd H ₂ O	6,2 ml
TEMED konz.	5 µl	TEMED konz.	7,5 µl
APS 10 %	150 µl	APS 10%	200 µl

8.10.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung:	40%	Isopropanol techn.
	7 %	Essigsäure techn.
	0,2 %	Coomassie Brilliant Blue R-50

Coomassie-Entfärbelösung:	20 %	Isopropanol techn.
	7,5 %	Essigsäure

Borat-Transferpuffer (pH 8,8):	20 mM	Borsäure-NaOH (pH 8,8)
	1 mM	Na ₂ -EDTA
	4 mM	DTT

TBST-Puffer (pH 8,0):	10 mM	Tris-HCl pH 8,8
	150 mM	NaCl
	0,05 %	Tween 20

Ponceau-S-Stammlösung:	10 mM	Ponceau-S
	30 %	Trichloressigsäure
	30 %	Sulfosalicylsäure

Aminosäure-Stocklösungen:	Je 100 ml	
	240 mg	L-Histidin
	480 mg	L-Tryptophan
	720 mg	L-Leucin

Steril filtrieren, bei 4°C lagern und nicht autoklavieren.

Die Medien und Lösungen wurden stets mit ddH₂O angesetzt und einige von ihnen bei 121°C feuchter Hitze und 1 bar Überdruck autoklaviert. Die Hefemedien sollten nur für 15 min bei 121°C feuchter Hitze und 1 bar Überdruck autoklaviert werden, wie es der Hersteller empfiehlt.

8.11 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
1,5 und 2,0 Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Ampullen zum Einfrieren von Zellen	Nunc, Wiesbaden
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einweg Impfösen	Greiner, Nürtingen
Falcon Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, Franklin Labware, N.J. USA
Faltenfilter	Neolab, Heidelberg
Glasplättchen für die Zellkultur	Langenbrinck, Emmendingen
Halbmikroküvetten	Greiner, Nürtingen
Kultivierungsschalen für Zelllinien	Becton Dickinson, Franklin Labware, N.J. USA
T75 Zellkulturflaschen	Falcon Becton Dickinson, Franklin Labware, N.J. USA
Nitrocellulose Membran	Schleicher und Schueller, Dassel
Objektträger mit Mattrand	Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen	Star lab, Ahrensburg
PVDF Membran	Millipore, Eschborn
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Skalpells	Bahya, Tuttlingen
Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Impfnadeln	Greiner, Nürtingen

Tabelle 14: Häufig verwendete Verbrauchsmaterialien.

8.12 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
ABI PRISM 7700 Sequence Detector	PE, Massachusetts USA
Agilent 2100 Bioanalytiker	Agilent Technologies, Boeblingen
Biofuge piccolo	Heraeus, Hanau

Geräte

Brutschrank für die Bakterienkultur
 Brutschrank für die Hefekultur
 Brutschrank für die Zellkultur (Thermo Forma)
 Brutschrank (TECO20, klein)
 Cytospin 3
 Elektrophorese Netzgeräte
 Entwicklermaschine (Immun-Blot-Filme)
 Hyper Processor
 Feinwaage
 Gasprofi
 Gel-Dokumentationsanlage E.A.S.Y.
 Gelkammern (für Agarosegele)
 Gelkammern (SDS-Gelelektrophorese)
 Gefrierschränke (-20°C)
 Gefriertruhe (-80°C)
 Heizblock
 Heizplatte mit Magnetrührer
 Kühlschränke
 Kälzentrifuge Avanti J-25
 Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP2
 Magnet
 Magnetrührer
 Multifuge 4 UR
 Naßblotkammer
 PCR-Maschine
 Pipetboy
 Pipetten

Hersteller

Heraeus, Hanau
 Heraeus, Hanau
 Thermo Life Sciences, Dreieich
 Selutec, Mössingen
 Shandon, Frankfurt
 Biotec Fischer, Heidelberg
 jetzt: Amersham Biosciences, Freiburg
 früher: Agfa, Leverkusen
 Mettler Toledo, Schweiz
 Wartewig Labortechnik, Göttingen
 Herolab, Wiesloch
 Cti-GmbH, Idstein-Taunus
 Cti-GmbH, Idstein-Taunus
 Liebherr, Ochsenhausen
 Bosch, Stuttgart
 Heraeus, Hanau
 Kisker, Mühlhausen
 VWR, Darmstadt
 Liebherr, Ochsenhausen
 Bosch, Stuttgart
 Beckman Coulter, Unterschleissheim- Lohhof
 Leica Microsystems, Mannheim
 Dynal, Hamburg
 Ikamag, Staufien
 Heraeus, Hanau
 Bio Rad, München
 MJ Research, BIOZYME, Oldendorf
 Integra Biosciences, Fernwald
 Gilson, Frankreich

Geräte	Hersteller
pH-Meter	Schott, Mainz
Schüttler (Hefe-und Bakterienkultur)	Bühler, Tübingen Braun, Melsungen
Spektralphotometer (Bestimmung der OD)	Hitachi, Scientific Instruments Schwäbisch Gmünd Amersham Biosciences, Freiburg
Spektralphotometer zur DNA-Konzentrationsbestimmung „Gene Quant“	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilbank (Hera safe, Hefekultur)	Heraeus, Hanau
Sterilbank (Zellkultur)	The Baker Company, USA
Überkopfschüttler	MBT Brand, Gießen, Macs Mix, Miltenyi Biotec USA
Ultraschall Homogenisator Sonoplus HD2070	Bandelin, Berlin
UV-Platte (302 nm)	Konrad Benda, Wiesloch
Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau
Vibrax	IKA-Werke, Staufen
Vortex	Neo lab Migge, Heidelberg
Wasserbäder	Julabo, Seelbach
Wippschüttler	Dunn Labortechnik, Asbach
ABI PRISM 7700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems, USA
PCR: PerkinElmer Gene Amp PCR system 9600 and 9700	PerkinElmer Life Sciences GmbH, Rodgau - Jügesheim, Germany
Gel Documentation System	Biorad Laboratories GmbH, Munich
Fluorescence Microscope Axioplan	Zeiss, Oberkochen

8.13 DNA Techniken

8.13.1 Herstellung von Expressionsplamiden

Herstellung von Expressionsplasmiden zur Transformation in Hefezellen

1. Verschiedene hum LBR cDNA Konstrukte in pGBKT7

Zur Erstellung der *Bai*-Vektoren für den *YTH*-Ansatz wurden mit Hilfe von geeigneten Primern das entsprechende cDNA Stück auf dem Plasmidvektor, der das volle Länge LBR cDNA Konstrukt trug, amplifiziert. Dabei wurden sie mit den geeigneten Enzymschnittstellen zur Klonierung in die „multiple cloning site“ des pGBKT7 Vektors versehen. Anschließend wurden die cDNA Fragmente über diese Schnittstellen in den Vektor einkloniert und durch Sequenzierung überprüft.

Expressionsplasmid	cDNA-Fragment	Primer	Schnittstellen
pGBKT7 A1LBR (AS 1+AS–207)	LBR (AS 1+AS–207)	N1LBR/N2LBR	Nco I / BamH I
LBR AS 61-207	LBR (AS 61-207)	N61 LBR / N2 LBR	Nco I / BamH I

Tabelle 15: Expressionsplasmide, das enthaltene cDNA-Fragment, die verwendeten Primer sowie die Schnittstellen, die zur Klonierung in den Vektor verwendet wurden.

2. Verschiedene cDNA Konstrukte von hum LBR in pBTM 117c und pGAD426

Zur Erstellung der „bait“-Vektoren und der *Beute*-Vektoren für den konstitutiven *YTH-high throughput*-Ansatz in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wanker wurden mit Hilfe von geeigneten Primern die entsprechenden cDNA Teilkonstrukte auf dem Plasmidvektor, der das volle Länge LBR cDNA Konstrukt trug, amplifiziert. Dabei wurden sie mit den geeigneten Enzymschnittstellen zur Klonierung in die „multiple cloning site“ des pGBKT7 bzw. des pGAD426 Vektors versehen. Anschließend wurden die in der Folgenden Tabelle aufgeführten cDNA Fragmente über diese Schnittstellen in den Vektor pBTM 117c bzw. den pGAD 426 Vektor einkloniert und durch Sequenzierung überprüft.

Expressionsplasmid	cDNA-Fragment	Primer	Schnittstelle
pBTM 117c 1 LBR (AS 105 – 210)	LBR (AS 105 – 210)	(3/4R LBR)	Sal I / Not I
pGAD 426 1 LBR (AS 105 – 210)	LBR (AS 105 – 210)	(3/4R LBR)	Sal I / Not I
pBTM 117c 2 LBR (AS 344 – 385)	LBR (AS 344 – 385)	(5/6R LBR)	Sal I / Not I
pGAD 426 2 LBR (AS 344 – 385)	LBR (AS 344 – 385)	(5/6R LBR)	Sal I / Not I

Expressionsplasmid	cDNA-Fragment	Primer	Schnittstelle
pBTM 117c 3 LBR (AS 431 – 493)	LBR (AS 431 – 493)	(7/8R LBR)	Sal I / Not I
pGAD 426 3 LBR (AS 431 – 493)	LBR (AS 431 – 493)	(7/8R LBR)	Sal I / Not I
pBTM 117c 4 LBR (AS (576)577 – 615)	LBR (AS (576)577 – 615)	(9/10R LBR)	Sal I / Not I
pGAD 426 4 LBR (AS (576)577 – 615)	LBR (AS (576)577 – 615)	(9/10R LBR)	Sal I / Not I
pBTM 117c 7 LBR (AS 1 –105)	LBR (AS 1 –105)	(11/2R LBR)	Xho I / Not I
pGAD 426 7 LBR (AS 1 –105)	LBR (AS 1 –105)	(11/2R LBR)	Xho I / Not I
pBTM 117c 8 LBR (AS 1 –210)	LBR (AS 1 –210)	(11/4R LBR)	Xho I / Not I
pGAD 426 8 LBR (AS 1 –210)	LBR (AS 1 –210)	(11/4R LBR)	Xho I / Not I
pBTM 117c 9 LBR (AS 59 – 150)	LBR (AS 59 – 150)	(13/14R LBR)	Xho I / Not I
pGAD 426 9 LBR (AS 59 – 150)	LBR (AS 59 – 150)	(13/14R LBR)	Xho I / Not I
pBTM 117c 10 LBR (AS 230 – 326)	LBR (AS 230 – 326)	(15/16R LBR)	Sal I / Not I
pGAD 426 10 LBR (AS 230 – 326)	LBR (AS 230 – 326)	(15/16R LBR)	Sal I / Not I
pBTM 117c 11 LBR (AS 471 – 550)	LBR (AS 471 – 550)	(17/18R LBR)	Sal I / Not I
pGAD 426 11 LBR (AS 471 – 550)	LBR (AS 471 – 550)	(17/18R LBR)	Sal I / Not I
pBTM 117c 12 LBR (AS 314- 410)	12 LBR (AS 314- 410)	(19/20R LBR)	Sal I / Not I
pGAD 426 12 LBR (AS 314- 410)	12 LBR (AS 314- 410)	(19/20R LBR)	Sal I / Not I
pBTM 117c 13 LMNB2 Head Coil I (AS 1- 230)	13 LMNB2 Head Coil I (AS 1- 230)	(1/2R LMNB2)	Sal I / Not I
pGAD 426 13 LMNB2 Head Coil I (AS 1- 230)	13 LMNB2 Head Coil I (AS 1- 230)	(1/2R LMNB2)	Sal I / Not I
pBTM 117c 14 LMNB2 Rod (AS 23- 383)	LMNB2 Rod (AS 23- 383)	(3/4R LMNB2)	Sal I / Not I
pGAD 426 14 LMNB2 Rod (AS 23- 383)	LMNB2 Rod (AS 23- 383)	(3/4R LMNB2)	Sal I / Not I
pBTM 117c 15 LMNB2 Coil II (AS 236- 377)	LMNB2 Coil II (AS 236- 377)	(5/6R LMNB2)	Sal I / Not I
pGAD 426 15 LMNB2 Coil II (AS 236- 377)	LMNB2 Coil II (AS 236- 377)	(5/6R LMNB2)	Sal I / Not I
pBTM 117c 16 LMNB2 Tail+5Hep (AS 348- 600)	LMNB2 Tail+5Hep (AS 348- 600)	(7/8R LMNB2)	Sal I / Not I
pGAD 426 16 LMNB2 Tail+5Hep	LMNB2 Tail+5Hep	(7/8R LMNB2)	Sal I / Not I

Expressionsplasmid	cDNA-Fragment	Primer	Schnittstelle
(AS 348- 600)	(AS 348- 600)		

Tabelle 16: Expressionsplasmide, das enthaltene cDNA-Fragment, die verwendeten Primer sowie die Schnittstellen, die zur Klonierung in den Vektor verwendet wurden.

8.13.2 Herstellung von Expressionsplasmiden zur Transformation in Bakterien

1. Verschiedene cDNA Konstrukte von hum LBR in pBTM 117c und pGAD426

Um die ursprünglichen „bait“-Konstrukte als GST-Fusionsproteine in BL21(DE3) Bakterien exprimieren zu können, wurde die cDNA aus dem pGBKT7 in den pGEX 4T1 Vektor, der das Glutation-S Transferase Gen enthielt, umklont. Dazu wurde das A1 LBR-Konstrukt mittels der Primer 11LBR und N2 das A4 LBR-Konstrukt mittels der Primer 13LBR und N2 durch PCR auf dem Plasmid mit der volle Länge LBR cDNA hergestellt (Ye and Worman 1996) Beide cDNA-Konstrukte wurden über die Schnittstellen XhoI / BamHI in den Vektor pBT+ einkloniert, aus pBT+ mittels der Schnittstellen XhoI / NotI in den Vektor pGAD426 umklont und über die Schnittstellen EcoRI / NotI in den Vektor pGEX (+NcoI) einkloniert. Alle Konstrukte wurden anschließend durch Sequenzierung überprüft.

Expressionsplasmid	cDNA-Fragment	Schnittstellen
pGEX 4T1 (+NcoI) A1 LBR AS 1(+1AS)– 207	LBR AS 1(+1AS1– 207)	EcoRI / Not
pGEX 4T1 (+NcoI) A4 LBR (AS 61-207)	LBR (AS 61-207)	EcoRI / Not

Tabelle 17: Expressionsplasmide, das enthaltene cDNA-Fragment, die verwendeten Primer sowie die Schnittstellen, die zur Klonierung in den Vektor verwendet wurden.

2. Auch die ursprünglichen „bait“-Konstrukte aus dem „YTH-high-throughput“- Ansatz wurden als GST-Fusionsproteine in BL21 (DE3) Bakterien exprimiert. Dazu wurden sie aus dem Hefevektor pGAD 426 in den Vektor pGEX 4T1 (+NcoI) umklont. Dies geschah mittels der in der Tabelle angegebenen Schnittstellen. Alle Konstrukte wurden anschließend durch Sequenzierung überprüft.

Expressionsplasmid	cDNA-Fragment	Schnittstellen
pGEX 4T1 (+NcoI) 1 LBR AS (05 – 210)	LBR AS (05 – 210)	Eco RI / Not I
pGEX 4T1 (+NcoI) 3 LBR(AS 431 – 493)	LBR(AS 431 – 493)	Eco RI / Not I
pGEX 4T1 (+NcoI) 4 LBR AS (576)577 – 615)	LBR AS (576)577 – 615)	Eco RI / Not I

Expressionsplasmid	cDNA-Fragment	Schnittstellen
pGEX 4T1 (+NcoI) 7 LBR (S 1 –105)	LBR (S 1 –105)	Eco RI / Not I
pGEX 4T1 (+NcoI) 8 LBR (AS 1 –210)	LBR (AS 1 –210)	Eco RI / Not I
pGEX 4T1 (+NcoI) 9 LBR (AS 59 – 150)	LBR (AS 59 – 150)	Eco RI / Not I
pGEX 4T1 (+NcoI) 16 LMNB2 Tail+5Hep (AS 348-600)	LMNB2 Tail+5Hep (AS 348-600)	Eco RI / Not I
pGEX 4T1 (+NcoI) + Seq146 hLB1 pot. Ig-Fold Domain	hLB1 pot. Ig-Fold Domain	Eco RI / Not I

Tabelle 18: Expressionsplasmide, das enthaltene cDNA-Fragment, die verwendeten Primer sowie die Schnittstellen, die zur Klonierung in den Vektor verwendet wurden.

8.13.3 Herstellung der Expressionsplasmide zur *in vitro* Translation

1. Zur *in vitro* Translation der im YTH-Ansatz HD bzw. der im YTH-high throughput – Screen erhaltenen Interaktionspartner wurden diese „prey“-Proteine in den Vektor pBT+ kloniert. Dazu wurde mithilfe der in der Tabelle angegebenen Primer eine PCR auf dem Plasmidvektor mit dem jeweiligen volle Länge Protein (siehe Tabelle) durchgeführt. Anschließend wurde das cDNA-Konstrukt mittels der in der Tabelle angegebenen Schnittstellen in den Vektor pBT+ einkloniert.

Erhaltenes Expressionsplasmid	PCR auf dem Plasmidvektor	Primer	Schnittstellen
pBT IIKS + (CKN1)	pDNR-LIB+CKN1	CKN1_F / CKN1_RC	EcoRI / Not
pBT IIKS+ (PRCBP1)	pCMV Sport6 + (PRCBP1) K18.2	18_2F / 18_2RC	EcoRI / NotI
pBT IIKS+ (RNU2)	pOTB7 + (RNU2) K23.1	23_1F / 23_1RC	EcoRI / BamHI
pBT IIKS+ (SF3A2)	pOTB7 + (SF3A2) K24.1	24_1F / 24_1RC	EcoRI / Not
pBT IIKS+ vl(PTN)	pACT2 + vl(PTN)	18B_F / 18B_RC	EcoRI / BamHI
pBT IIKS+ vl(RBBP4)	pACT4-1b + vl(RBBP4)	13B_F / 13B_RC	EcoRI / NotI
pBT IIKS+ vl(TUBA3)	pACT4-1b + vl(TUBA3)	14B_F / 14B_RC	XhoI / BamHI
pBT IIKS+ vl(TUSC4)	pACT4-1b + vl(TUSC4)	1B_F / 1B_RC	EcoRI / BamHI

Tabelle 19: Expressionsplasmide, das enthaltene cDNA-Fragment, die verwendeten Primer sowie die Schnittstellen, die zur Klonierung in den Vektor verwendet wurden.

8.13.4 Herstellung von Expressionsplasmiden zur Transfektion von Zell-Linien

Expressionsplasmid	PCR auf Plasmidvektor	Primer	Schnittstellen
pEGFP-C1 frame3 +(CKN1)	pDNR-LIB+CKN1	CKN1_F /CKN1_RC	Sall /NotI
pEGFP-N1+(CK N1)	pDNR-LIB+CKN1	CKN1_F /CKN1_RN	EcoRI /AgeI
pEGFP-C1 frame3 +(PRCBP1)	pCMV Sport6 + (PRCBP1) K18.2	18_2F /18_2RC	Sall / NotI
pEGFP-N1 +(PRCBP1)	pCMV Sport6 + (PRCBP1) K18.2	18_2F /18_2RC	EcoRI / AgeI
pEGFP-C1 frame3 +(RNU2)	pOTB7 + (RNU2) K23.1	23_1F /23_1RC	BspEI / BamHI
pEGFP-N1 +(RNU2)	pOTB7 + (RNU2) K23.1	23_1F /23_1RC	EcoRI / AgeI
pEGFP- C1 frame3 + (SF3A2)	pOTB7 + (SF3A2) K24.1	24_1F /24_1RC	Sall / NotI
pEGFP-N1 + (SF3A2)	pOTB7 + (SF3A2) K24.1	24_1F /24_1RC	
pEGFP- C1 frame3 + vl(PTN)	pACT2 + vl(PTN)	18B_F /18B_RC	BspEI / BamHI
pEGFP-N1 + vl(PTN)	pACT2 + vl(PTN)	18B_F /18B_RC	EcoRI / AgeI
pEGFP- C1 frame3 + vl(RBBP4)	pACT4-1b + vl(RBBP4)	13B_F /13B_RC	Sall /NotI
pEGFP-N1 + (RBBP4)	pACT4-1b + vl(RBBP4)	13B_F /13B_RC	EcoRI / AgeI
pEGFP- C1 frame3 + (TUBA3)	pACT4-1b + vl(TUBA3)	14B_F und 14B_RC	BspEI / BamHI
pEGFP- C1 frame3 + (TUSC4)	pACT4-1b + vl(TUSC4)	1B_F und 1B_RC	BspEI / BamHI
pEGFP-N1 + (TUSC4)s	pACT4-1b + vl(TUSC4)	1B_F und 1B_RC	BspEI / Age I

Tabelle 20: Expressionsplasmide, das enthaltene cDNA-Fragment, die verwendeten Primer sowie die Schnittstellen, die zur Klonierung in den Vektor verwendet wurden.

8.13.5 Herstellung transformationskompetenter E. coli Zellen

Durch die Behandlung von E.coli-Zellen mit einer Calciumchlorid-Lösung kann deren Kompetenz für die Aufnahme von außen zugeführter Plasmid-DNA erhöht werden. Dazu wurden 5 ml einer E.coli über Nacht Kultur mit LB-Medium 1:100 auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnt und anschließend bei 37°C unter Schütteln bei 250

UpM bis zu einer OD600 = 0,5 – 0,6 inkubiert. Diese Bakterienkultur wurde bei 0°C für 5 min bei 5000 UpM in einer Beckmann J2-HS-Zentrifuge mit einem JA-14 Rotor sedimentiert. Das Sediment wurde in 125 ml eiskalter steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und dann erneut wie oben beschrieben sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in 21,5 ml einer Einfrierlösung (0,1 M CaCl₂; 15% Glycerin (v/v)) aufgenommen, zu je 100 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei – 80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

8.13.6 DNA Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

Die Vermehrung von Plasmid-DNA konnte durch deren Transformation in transformationskompetente *E.coli* Bakterien erreicht werden. Anschließend folgte die Vermehrung der transformierten Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurde Plasmid-DNA mit Resistenzmarkern gegen Ampizillin, Kanamycin und Chloramphenicol verwendet. Durch die Aufnahme eines solchen Plasmid-Vektors wurde den Bakterienkolonien das Wachstum auf Selektionsnährmedienböden mit dem geeigneten Antibiotikum ermöglicht. Transformiert wurde in die zuvor transformationskompetenten Bakterienzellen der Stämme *E. coli* TG1, DH5α, -T1 oder SCS110 sowie *E. coli* sure. Zur gezielten Protein Expression wurden *E.coli* BL21DE3 codon+ sowie JM109 verwendet. Durch ihre Fähigkeit Kanamycin abzubauen, können *E. coli* sure jedoch nicht auf Kanamycin Nährmedienplatten verwendet werden. Zur Durchführung der Transformation wurden die bei – 80°C gelagerten kompetenten *E. coli* Bakterienzellen für 10 min auf Eis aufgetaut. Es folgte die Zugabe von etwa 4 – 10 ng, jedoch nicht mehr als 5 - 10 µl der entsprechenden Plasmid-DNA. Nach weiteren 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 3 min einem Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad unterzogen, gefolgt von 1 min Inkubation auf Eis. Bei der Verwendung des *E.coli* DH5α Bakterienstammes wurde der Hitzeschock für 30 s bei 42°C durchgeführt gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Nach der Inkubation auf Eis wurden 400 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zu dem Ansatz gegeben und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die *E. coli* DH5α Bakterien benötigten 400 µl SOC-Medium.

8.13.7 *Animpfen einer Bakterienkultur*

Die mit dem gewünschten Plasmidkonstrukt transformierten Bakterienzellen wurden z.B. für eine DNA-Präparation im kleinen Maßstab auf einer Selektionsplatte vermehrt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden einzelne Kolonien abgenommen und damit je 2 ml flüssiges Selektionsmedium mit 100 µg / ml Antibiotikum angeimpft. Bei Verwendung von TB-Medium konnten die Kulturen bereits nach 6 h Inkubation bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 250 UpM geerntet werden. Bei Verwendung von LB-Medium wurden die Kulturen 24 h inkubiert. Zur Extraktion der DNA folgte die DNA-Präparation im kleinen Maßstab. Für eine DNA-Präparation im großen Maßstab wurden 200 ml LB-Medium mit 100 µg / ml Antibiotikum mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und ebenfalls unter Schütteln 24 h inkubiert.

8.13.8 *Präparation von Plasmid-DNA*

Im kleinen Maßstab: Die gewünschte Plasmid-DNA wurde zunächst in einen geeigneten E. coli Bakterienstamm transformiert. Von den transformierten Bakterien wurde anschließend eine Kolonie zum Beimpfen von 2 ml LB-Mediums verwendet. Diese Kultur wurde über Nacht in einem Schüttelinkubator vermehrt. Zur Amplifikation von cDNA-Konstrukten in Plasmid-Vektoren mit dem Kanamycin-Resistenzgen wurden die Stämme E. coli TG1, DH5αTM-T1R oder SCS110 sowie E. coli sure verwendet. Der E. coli sure Bakterienstamm eignete sich nicht zur Transformation mit cDNA-Konstrukten, die in Plasmid-Vektoren mit dem Kanamycin-Resistenzgen vorlagen. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin-miniprep Systems (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltene DNA wurde so verdünnt, dass sie in einer Endkonzentration von 0,5-1 µg/µl vorlag. **Im großen Maßstab:** Zur Herstellung von Plasmid-DNA im großen Maßstab zunächst 200 ml einer LB-Medium mit der geeigneten Antibiotika-Selektion mit 5 ml einer Vorkultur beimpft und nach der über Nacht bei 37°C und 250 UpM im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 250 ml-Zentrifugenbecher überführt und bei 5000 UpM und 4°C für 10 min im vorgekühlten JA 10 Rotor sedimentiert. Die Bakteriensedimente wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder in 40 ml des entsprechenden Selektionsmedium resuspendiert, in 50 ml Falcongefäße überführt, nochmals für 10 min bei 4°C und 5000 Upm sedimentiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Aufarbeitung der DNA aus

dem Bakteriensediment erfolgte im Anschluss mit Hilfe des Maxiprep Kits von Quiagen (Hilden). Die so erhaltene DNA wurde je nach Sedimentgröße in 200-400 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Endkonzentration sollte zwischen 0,5-1 µg/µl betragen.

8.13.9 Bestimmung der DNA-Konzentration von Oligonucleotiden sowie von Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Konzentration von Oligonucleotid-Lösungen wurde deren OD bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers („Gene Quant“, Amersham Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Zumeist wurden dazu ein Verdünnungsfaktor k von 1:100 in H₂O dd eingesetzt. Anhand der gemessenen OD-Werte und unter Verwendung der folgenden Formeln konnte die Konzentration für Oligonucleotide (i) bzw. für Plasmid-DNA (ii) berechnet werden.

$$(i) \quad c = OD_{260 \text{ nm}} \times 33 \text{ µg / ml} \times 1/k$$

$$(ii) \quad c = OD_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ µg / ml} \times 1/k$$

Die Reinheit der DNA konnte über den Quotienten OD_{260 nm}/ OD_{280 nm} ermittelt werden, der etwa bei 1,8 liegen sollte. Dabei gibt die OD_{280nm} über die Menge der gelösten Proteine Auskunft.

8.13.10 Präparativer und analytischer Restriktionsverdau

Bei einem präparativen Verdau wurden unter Verwendung von Restriktionsenzymen DNA-Fragmente aus der „Multiple Cloning Site“ von Plasmid-Vektoren mittels ihrer flankierenden Restriktionsschnittstellen herausgeschnitten. Auf dieselbe Weise konnten auch PCR-Produkte zur weiteren Klonierung bearbeitet werden. Die so gewonnenen Vektor-Fragmente bzw. c-DNA-Fragmente wurden anschließend für die weitere Klonierung verwendet. Für den Restriktionsverdau eines PCR-Produktes wurde nach dessen Aufreinigung der gesamte PCR-Ansatz verdaut. Für den Verdau eines Plasmid-Vektors wurden 2 - 4 µg DNA eingesetzt und mit 5 - 10 Einheiten der entsprechenden Restriktionsenzyme in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und in 20 - 30 µl Endvolumen bei 37°C für 1 - 2 h inkubiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Volumenmenge an Enzym 5 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten durfte, da ein höherer Glyceringehalt die Aktivität des Enzyms beeinträchtigen würde. Dies war besonders im Fall eines Doppelverdaus mit zwei Enzymen zu beachten. Waren bei einem Doppelverdau die empfohlenen Puffersysteme der beiden Enzyme nicht kompatibel, so wurde der Ansatz nach dem

Verdau mit dem ersten Enzym aufgereinigt und anschließend ein Verdau mit dem zweiten Enzym im geeigneten Puffersystem durchgeführt. Danach wurden 5 µl des Ansatzes über eine Agarose-Gel-Elektrophorese bezüglich der Vollständigkeit des Verdau analysiert. Zur Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde der gesamte Verdauansatz mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt, in die Tasche eines 1%igen präparativen Agarose-Gels in TBE-Puffer geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden mit der richtigen Größe wurden jeweils mit einem unbenützten Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dazu wurde das Gel auf eine langwellige und dadurch niederenergetische UV-Durchleuchtungsplatte mit 230 nm Wellenlänge auf eine Plastikfolie aufgelegt. Die ausgeschnittenen Banden wurden für 5 min in Bandenwaschpuffer inkubiert und dieser wieder vollständig abgenommen. Vor der Ligationsreaktion konnte das DNA-Fragmente entweder unter Verwendung des Gel-Extraktions-Kits (Quiagen, Hilden) aufgereinigt werden. Die Gelstücke konnten jedoch auch direkt in der geeigneten Verdünnung für eine sog. In-Gel-Ligationsreaktion eingesetzt werden. Ein analytischer Restriktionsverdau wurde zur Überprüfung des Vorhandenseins eines gewünschten DNA-Fragmentes in einem Vektor wie sie z.B. zur Überprüfung einer Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt. Die Durchführung des Verdauansatzes erfolgte wie oben für den präparativen Verdauansatz beschrieben.

8.13.11 Gelextraktionsverfahren zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde durch elektrophoretische Auftrennung über ein 1%iges präparatives GTG-Agarose-Gel vorgenommen. Das gewünschte DNA-Fragment konnte nach der Elektrophorese mit Hilfe langwelligem UV-Lichts sichtbar gemacht und darauf aus dem Gel ausgeschnitten werden. Um das DNA-Fragment der gewünschten Größe anschließend aus dem Gel herauszulösen wurde das Qiagen Agarose Gel Extraction Kit Systems (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

8.13.12 Amplifikation von cDNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mulis et al., (1987) entwickelte Methode wurde zur gezielten Vermehrung von definierten Genabschnitten anhand einer vorhandenen genomischen DNA oder anhand von DNA-Fragmenten verwendet. Die Selektivität der PCR wurde durch die

Auswahl der Oligonukleotid-Primer erreicht. Die Primer wurden konstruiert, dass jeweils 20 – 30 bp komplementär zum Enden des Matrizenstranges bzw. des Gegenstranges der zu replizierenden DNA vorlagen. Zudem wurde darauf geachtet, dass der CG-Gehalt der Primer 50-60% nicht überschritt und die Schmelztemperaturen (T_m) der beiden Primer maximal um 10 K voneinander abwichen. Die enzymatische Duplikation der DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern wurde durch eine Polymerase vorgenommen. Besonders geringe Fehlerraten konnte dabei mit einer DNA-Polymerase mit Kontrollfunktion sog. „proof-reading“ erreicht werden, wie sie bei der Pfu-Polymerase (Roche, Mannheim) gewährleistet wird. Diese wurde besonders zur Vermehrung großer DNA-Fragmente und von Fragmenten, die zur weiteren Klonierung eingesetzt wurden verwendet. Eine rein analytische PCR konnte mit der Taq-Polymerase durchgeführt werden. Für einen Standard-PCR Ansatz wurden etwa 1 - 5 ng linearisierte oder auch nicht linearisierte Matrizen-DNA mit 5 µl 10x PCR-Puffer, 2 mM $MgCl_2$ und je 100 ng der Oligonukleotid-Primer sowie 5 µl 2 mM dNTP-Mix mit 2 U Taq-DNA-Polymerase versetzt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde in 500 µl Eppendorf-Gefäße angesetzt und in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt. Durch die Zugabe von bis zu 10 % DMSO konnte eine Erniedrigung der Schmelztemperatur der Primer erreicht werden. Mit zunehmendem Anteil an DMSO kam es jedoch auch verstärkt zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten. Sollten besonders große DNA-Fragmente Vermehrt werden, wurde die Dauer (t) für den Extensions-Schritt berechnet indem die Anzahl der Kilobasen des zu Vermehrenden Fragments mit dem Faktor 1,5 multipliziert wurde und bei jedem weiteren Zyklus zusätzlich um 5 s verlängert wurde. Das Temperaturprofil wurde anhand der unten aufgeführten Tabelle berechnet (siehe Tabelle 21). Die sog. „Annealing“-Temperatur errechnete sich anhand der Schmelztemperatur der Primer abzüglich 5 K. Zumeist wurde jedoch 54°C für eine T_m unter 70°C und 65°C für eine T_m über 70°C der Primerpaare verwendet. Die Temperatur für die Extension betrug 72°C für bis zu 2000 bp und 68°C für größere DNA-Fragmente.

	Temperatur	Dauer (t)
1. Primäre Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	1 min

3. "Annealing" ($T_m - 5\text{ K}$)	54°C	2 min
4. Extension	72°C	2 – 4 min ($t = n\text{KB} \times 1,5\text{ min}$)
5. Schleife: 29 x ab Schritt 2		
6. Abschließende Extension	72°C	10 – 15 min

Tabelle 21: Temperaturprofil der PCR-Reaktionen.

Zur Analyse der entstandenen Fragmente wurden 5 µl des Ansatzes mit 2 µl 6x DNA-Probenpuffer und 5 µl ddH₂O versetzt, auf ein analytisches Agarosegel aufgeladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

8.13.13 RT-PCR

Die für die RT-PCR verwendete cDNA wurde ausgehend von mRNA aus HL-60/S4 Kulturzellen durchgeführt. Dazu wurde die isolierte mRNA mit Hilfe von „random hexamer“ primern in einer RT-PCR-Reaktion in die komplementäre cDNA „reverse“ umgeschrieben. Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des GeneAmp RNA PCR Kit Nr. N808-0143 (Applied Biosystems, Foster City, CA) nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Durch die Zugabe von „T4 gene 32 protein“ Cat. No. 972983 (Roche, Mannheim) wurde die *in vitro* DNA Synthese verstärkt angeregt und einzelsträngige DNA stabilisiert. Der RT-PCR Ansatz setzte sich zusammen wie folgt:

4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	10 x PCR Puffer II
1 µl	random Hexamere
2 µl jeweils	dGTP (1 mM) dATP (1 mM) dCTP (1 mM) dTTP (1 mM)
(1 µl)	(RNase Inhibitor <i>wurde nicht zugegeben</i>)
1 µl	MuLV reverse Transcriptase
1 µl	DEPC H ₂ O
1 µl	T4 gene 32 Protein (Roche ; Cat No. 972983)
2 µl	Hum Referenz RNA (500 µg/µl)
20 µl	Endvolume

Tabelle 22: RT-PCR Ansatz.

8.13.14 „Real-time quantitative reverse“-PCR (RT-PCR)

Grundlagen der RT-PCR

Die quantitativ vergleichende Untersuchung der Expression von genspezifischer mRNA aus HL-60/S4 Kulturzellen wurde mittels der RT-PCR durchgeführt. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität und damit verbundenen geringen Einsatzmengen ist die RT-PCR alternativen Techniken wie z. B. „Northern Blotting“ bei der quantitativen Analyse vorzuziehen. Dieser heute als „TaqMan-PCR Assay“ bekannte Methode wurde von Lee et al. (1993) entwickelt der auf dem ursprünglichen 5'-Nuklease-Assay von Holland et al. (1991) basiert. Die Detektion der PCR Produkte beruht auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, der in der sogenannten kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet. Gebundene Fluorochrommoleküle zeigen ein starkes Fluoreszenzsignal, ungebundener Farbstoff zeigt nahezu keine Fluoreszenz. Ein Nachteil der Methode liegt darin, dass die Spezifität allein durch die verwendeten Primer bedingt wird und prinzipiell die Anwesenheit jeglicher doppelsträngiger DNA, also auch die von Primer-Dimeren oder Nebenprodukten, zum Fluoreszenzsignal beitragen kann (Bustin 2000). Daher wird die Sensitivität nach Abschluss der PCR-Reaktion anhand der Schmelzkurve des Produktes

überprüft, wobei eventuell vorhandene störende Nebenprodukte erkannt werden können.

Anwendung RT-PCR auf HL-60/S4 cDNA

Jede der cDNA Proben wurden im Duplikat unter Verwendung des ABI PRISM 7700 Sequence detector (PE Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA) analysiert. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes „SYBR Green I“ detektiert. Die RT-PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von je 20 µl entsprechend den Angaben des Herstellers „SYBR Green PCR and RT-PCR Reagents“ und TaqMan Universal Master Mix (Perkin and Elmer Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA) durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden in Microamp® „optical 96-Well Reaction Plates“ angesetzt und ausgelesen. Der PCR-Zyklus setzte sich aus zwei initialen Inkubationen von 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C sowie 45 Zyklen von je 15 s bei 95°C gefolgt von 1 min bei 60°C zusammen. Bei der PCR-Reaktion mit SYBR Green wurden diese Einstellungen um einen initialen Schritt von 30 min bei 30°C und drei abschließenden Inkubationen von 15 s bei 95°C, 15 s bei 60°C und 15 s bei 95°C erweitert. Die Geschwindigkeit des Aufheizens zwischen den letzten beiden Schritten wurde auf 20 min verringert, um eine Schmelzkurve der PCR-Produkts aufzunehmen und so die Spezifität der RT-PCR zu überprüfen. Dazu wurde die „ABI Prism Dissociation Curve Software“ (PE Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA) verwendet. Um möglichst homogene Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Reaktionsansätze zunächst als sog. „Mastermix“ gemischt der sich wie folgt zusammensetzte (siehe Tabelle 23):

SYBR 10x	2,0 µl
MgCl ₂	2,4 µl
DNTPs (mit dUTP)	1,6 µl
Ampli Taq Gold	0,12 µl
Amp Erase Ung	0,2 µl
H ₂ O	11,32 µl
Primer “forward”	0,18 µl
Primer “reverse”	0,18 µl

Template hum ref cDNA	2 µl
-----------------------	------

Tabelle 23: Reaktionsansätze für die RT-PCR.

Herstellung der Primer für die RT-PCR

Die für die RT-PCR verwendeten Primer wurden unter Verwendung der „Primer Express Software“ (PE Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA) unter Berücksichtigung der folgenden Parameter konstruiert (siehe Tabelle 24):

Primer-Länge	18-24 Nukleotide (optimal: 24 Nukleotide)
Schmelztemperatur (T _m)	58 – 60°C (optimal: 59°C)
GC-Gehalt (%GC)	30 – 80% (optimal: 60%)
Amplikon Länge	50 – 150 bp
Wahrscheinlichkeit der Primer Dimerisierung	So gering wie möglich
G bzw. C in den letzten 5 Basen am 3'-Ende	2 – 3
Identische Basenwiederholungen	Maximal 3 (keine G Wiederholungen)

Tabelle 24: Bedingungen zur Primerkonstruktion.

Für die zu untersuchenden Gene wurden je drei Primer-Paare entworfen, die den oben aufgeführten Kriterien entsprachen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass ein oder beide Primer eine Exon-Grenze überspannten. Dadurch konnte verhindert werden, dass eventuell vorhandene genomische DNA amplifiziert wurde. Um zunächst die Spezifität der Primer-Paare zu testen, wurden PCR-Reaktionen mit allen Primer-Paaren auf humaner Referenz RNA durchgeführt, die zu diesem Zweck revers in cDNA umgeschrieben worden war. Jeweils eines der genspezifischen Primer-Paare wurde auf diese Weise ausgewählt.

Berechnung und Normalisierung der relativen mRNA-Menge aus den RT-PCR Daten

Die in dieser Arbeit durchgeführte RT-PCR wurde nicht mit dem Ziel einer absoluten Quantifizierung der mRNA eines bestimmten Genprodukts durchgeführt sondern immer in Relation zu einer kalibrierenden Probe, in diesem Fall bezüglich eines Haushalts-Gens dessen mRNA-Menge im Verlauf des Differenzierungsprozesse als konstant angenommen werden konnte. Die Berechnung der relativen RNA Mengen erfolgte anhand einer Regressionsgeraden, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe

humaner Referenz-DNA für jedes genspezifische Primer-Paar aufgenommen worden war. Diese Gerade korrelierte eine virtuelle mRNA-Menge mit der gemessenen Fluoreszenzintensität. Die Regressions-Eichgerade folgte der Formel $y = mx + b$ folgte. Daraus konnten nun die Werte für m (entspricht der Steigung) und b (entspricht der y -Achsenkoordinate) abgeleitet werden. Zur Analyse der Expressionsprofile bezüglich der Expressionsmenge einer genspezifischen RNA waren Proben aus HL-60/S4 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung entnommen worden. Anhand der zuvor bestimmten Formelparameter der Regressionsgeraden konnten nun die relativen mRNA-Mengen zu den analysierten Proben-Zeitpunkte quantitativ vergleichbar berechnet werden. Es folgte eine Normierung der Daten bezüglich der als immer konstant angenommenen Menge eines Haushalts-Genprodukts. Diese Normierung wurde notwendig durch die Tatsache, dass die einzelnen während des Differenzierungsprozesses entnommenen RNA-Proben bezüglich der tatsächlich extrahierten Zellzahl variierten. Die Normierung der Daten wurde durch die Standardisierung mit einer endogenen Kontrolle durchgeführt werden. Als endogene Kontrolle wurden sog. Haushaltsgene-Gene verwendet, deren Genprodukt-Menge pro Zelle zu jedem Zeitpunkt während der Zelldifferenzierung als konstant angenommen werden konnte. Zu diesem Zweck wurden für jede analysierte RNA-Probe, repräsentativ für einen Zeitpunkt der Differenzierung von HL-60/S4, die genspezifischen mRNA-Mengen für eines der Haushalts-Gene mittels RT-PCR-Werte ermittelt. In diesem Fall wurde dafür die Phosphoglyceratkinase (PGK) verwendet. Die für ein solches Haushaltsgen gefundenen Schwankungen der Gesamt-RNA-Mengen unter den einzelnen RNA-Proben wurden ausgeglichen indem die ermittelten genspezifische mRNA-Mengen mittels eben dieser endogenen Kontrollen normiert wurden. Ein zweiter Schritt der Normierung wurde bereits beim Auslesen der Proben durch den „ABI PRISM 7700 Sequence Detector,, (PE, Massachusetts USA) durchgeführt. Eine sogenannte „Passiv Referenz“ wurde durch die Verwendung von Reporter-Farbstoffen gewährleistet, der im 10x SYBR Green PCR Puffer enthalten war und während der PCR nicht amplifiziert wurde. Das Signal des SYBR Green-dsDNA-Komplex konnte gegen diese Passiv Referenz normalisiert werden. Diese Normalisierung war notwendig um Fluktuationen der Fluoreszenz auszugleichen, die durch Volumen- oder Konzentrationsunterschiede verursacht wurden. Letztlich wurden die Daten

unter Verwendung des Datenverarbeitungsprogramms EXCELL von Microsoft miteinander korreliert.

8.13.15 Aufreinigung von PCR-Produkten sowie von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau wurde der „Qiaquick PCR-Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurde der 50 µl PCR-Ansatz mit dem 5-fachen dieses Volumens PB-Puffer versetzt, auf die Säule mit DNA-bindender Matrix geladen und bei 13000 UpM zentrifugiert. Die Säule wurde gewaschen durch Zugabe von 700 µl PE-Puffer gefolgt von 1 min Zentrifugation bei 13000 UpM. Nachdem der Durchfluß verworfen worden war wurde erneut 1 min Zentrifugiert um den Restethanol zu entfernen. Vor der Elution mit 35 µl TE-Puffer pH 8,0 wurde die Säulenmatrix unter einer Lampe für 6 min an der Luft getrocknet. Die Zusammensetzung der Puffer PB und PE können dem Herstellerprotokoll entnommen werden.

8.13.16 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Rückligation linearisierter Vektoren während der Ligation zu verhindern, wurden deren 5'-Phosphatgruppen enzymatisch abgespalten. Der Dephosphorylierungsschritt erfolgte durch Zugabe einer Einheit alkalischer Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“, (SAP)) zum präparativen Restriktionsverdau-Ansatz etwa 45 min bevor dieser gestoppt wurde.

8.13.17 Kinasierung von Oligonukleotiden

Um die komplementären Oligonukleotide für die spätere Ligrationsreaktion vorzubereiten, wurden diese an ihren 5'-Enden phosphoryliert und dadurch die Ausbildung einer kovalenten Bindung mit den nicht phosphorylierten 3'-Enden des Vektors ermöglicht. Bei der Phosphorylierungsreaktion wurde von dem zugegebenen ATP-Molekülen das γ -Phosphat durch die Polynukleotidkinase auf das Oligonukleotid übertragen. Für die Kinasierung wurden 0,5 nM pro Oligonucleotid eingesetzt. Zunächst wurde daher die Molare Masse in der Oligonukleotide g/M sowie deren Konzentration bestimmt und daraus die für die Reaktionsansatz benötigte Menge errechnet. Die Oligonucleotide wurden mit 2 µl 10x Polynukleotidkinase-Puffer versetzt und mit dd H₂O auf ein Volumen von 18 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für

30 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurde 1 µl 10 mM ATP sowie 1 µl (=10 Einheiten) Polynukleotidkinase (Roche, Mannheim) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde das Enzym für 20 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Im Anschluß wurden die kinasierten Oligonukleotide hybridisiert.

8.13.18 Hybridisierung komplementärer Oligonucleotide

Die kinasierten komplementären Oligonukleotide wurden in einer Annealing-Reaktion hybridisiert und schließlich in den geöffneten und dephosphorylierten Vektor ligiert. Je 100 ng der beiden kinasierten Oligonucleotiden wurden in 50 µl TE-Puffer / NaCl vermischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Für die Ligationsreaktion wurden Ansätze mit 4 ng, 10 ng und 20 ng des Oligonucleotids hergestellt. Es folgte eine Ligationsreaktion. Die Annealingreaktion sollte unmittelbar vor der Ligation durchgeführt werden. Sehr große Oligonukleotide (zwischen 40 und 80 Nukleotiden) wurden aus zwei Oligonukleotidpaaren zusammengesetzt.

8.13.19 Auffüllreaktion „überhängender Enden“ nach einem Restriktionsverdau

Nach einem enzymatischen Verdau können die „überhängenden“ Enden der Schnittstellen durch eine Auffüllreaktion zu „glatten“ Enden umgestaltet werden. Glatte Enden konnten beliebig miteinander ligiert werden. Häufig blieb dabei jedoch die ursprünglichen Schnittstellen nicht erhalten. Nach dem Verdau mit dem Enzym, dessen Schnittstelle aufgefüllt werden sollte folgte zunächst die Aufreinigung über eine Säule oder präparatives Agarosegel. Anschließend wurde eine sogenannte „blunt-end“ Reaktion angesetzt. Hierzu wurde der gesamte Verdauansatz zusammen mit 5 µl 10x Polynukleotidkinase (PNK)-Puffer, 5 µl 2 mM dNTPs, 0,5 µl 100 mM rATP, 2 µl Polynukleotidkinase, 2 µl T4-DNA-Polymerase und ddH₂O auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht. Die Reaktion erfolgte für 3 h bei 37°C. Die Enzyme wurden durch Inkubation für 20 min bei 72°C hitzeinaktiviert. Es folgte der Verdau mit 1 µl des Enzyms, dessen Schnittstelle erhalten bleiben sollte und nicht aufgefüllt wurde. Der Ansatz wurde nochmals für 1 h bei 37°C inkubiert. Das so erhaltene cDNA-Fragment wurde über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und konnte im folgenden in einer Ligationsreaktion eingesetzt werden.

8.13.20 Ligation von DNA-Fragmenten nach dem In-Gel-Verfahren

Bei einer Ligation wird mit Hilfe der T4-DNA-Ligase eine Phosphodiester-Bindung zwischen der endständigen 5'-Phosphatgruppe und der endständigen 3'-OH-Gruppe zweier DNA-Stränge gebildet. Für die Ligation wurden 50 ng linearisierte, dephosphorylierte und über ein GTG-Gel aufgereinigte Vektor-DNA verwendet. Das einzuklonierende DNA-Fragment wurde dazu in einem molaren Verhältnis von Vektor zu Fragment wie 1:5 bis 1:10 eingesetzt. Sowohl Vektor als auch DNA-Fragment waren über ein GTG-Gel in TBE-Puffer aufgereinigt worden und die Banden mit einem jeweils frischen Skalpell pro Bande herausgetrennt worden. Nach einer Inkubation von 5 min in Bandenwaschpuffer wurden die Gelstücke bei 70°C geschmolzen und in der entsprechenden Verdünnung für die Ligation eingesetzt. Dabei sollte der Gelanteil 30% des Gesamtansatzes nicht übersteigen. Die Ligationsreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl. Hierzu wurden 2 µl des 10x Ligasepuffers und eine Einheit T4-DNA-Ligase zugegeben. Die Ligation erfolgte dann über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde aus jedem Ligationsansatz 5–10 µl entnommen und zur Transformation kompetenter Bakterienzellen eingesetzt oder bei –20°C eingefroren.

8.13.21 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten, aufgrund ihrer unterschiedlich starken negativen Ladung. Dabei ist die Wandergeschwindigkeit der Fragmente innerhalb eines bestimmten Größenbereiches umgekehrt proportional zur Fragmentgröße. Hierbei sollte die Agarosekonzentration im Gel und damit seine Feinmaschigkeit dem gewünschten Auftrennungsbereich angepasst werden. Diese Methode wurde zur Charakterisierung oder Reinigung von Plasmid-DNA nach einem Restriktionsverdauen oder einer PCR-Vermehrung eingesetzt.

Agarose-Konzentration	Trennungsbereich in Kilobasen (kb)
0,7%	1-30
1,0%	0,5-10
1,2%	0,4-7
1,5%	0,2-3
2,0%	0,05-2

Tabelle 25: Agarose Konzentration und Trennbereich in kb für DNA-Fragmente.

Häufig wurde ein 1%iges Agarosegel (SeaKem LE-Agarose, Biozym, Oldendorf) in 1x TBE verwendet. Die Agarose wurde in 1x TBE durch Aufkochen in Lösung gebracht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden 1,5 - 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, die Agarose in einen Gelschlitten gegossen und der Kamm zur Formung der Geltaschen eingesetzt. Nach ca. 20 min war das Gel bei RT ausgehärtet, konnte in eine entsprechende Elektrophoreseapparatur mit 1x TBE gefüllte gelegt werden. Pro Geltasche wurden 12 µl Probe geladen, welche bereits mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt worden war. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-90 V ohne Begrenzung der Stromstärke. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde stets ein DNA-Größenstandard (s. 3.5.1) mit aufgeladen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage bei 280 nm UV-Bestrahlung dokumentiert.

8.13.22 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde zur Überprüfung der Sequenzübereinstimmung mit der ursprünglichen Sequenz oder nach Einfügen von Oligonukleotidsequenzen nach einer Klonierung vorgenommen. Alle DNA-Sequenzierungen wurden mit Hilfe eines automatischen DNA-Sequenzierers durchgeführt. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip von Sanger *et al.*, (1977) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (Sanger, Nicklen *et al.* 1977). Alle DNA-Sequenzierungen wurden von Andreas Hunziker (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

8.14 RNA-Methoden

8.14.1 *Herstellung von Gesamt-RNA aus HL-60/S4 Kulturzellen*

Anreicherung der Zellen und Induktion mit Retinsäure

Für die RNA-Präparation aus HL-60/S4 Kulturzellen wurden diese Zellen in 75cm² Falcon- Kulturflaschen mit Filterdeckel unter Standardbedingungen gehalten. Um die benötigte Menge an Zellen anzureichern, wurden diese Ausgehend von einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 25 ml RPMI-Medium (10% FKS 1% Glutamin und 1% Penizillin/Streptomycin) 3x nach je 2 Tagen passagiert wurden, gefolgt von einer letzten Teilung nach einem Tag. So war gewährleistet, dass die Zellen sich zum Zeitpunkt der Präparation in einer optimalen Wachstumsphase befanden. Dabei wurden die vorliegenden Zellsuspension jedes mal wieder auf 1×10^5 Zellen/ml verdünnt. Am Tag der letzten Teilung wurden die Zellen mit 25 µl/25 ml (1 µg/µl Stocklösung) Retinsäure induziert. Zwei Tage nach der Induktion wurden schließlich die Zellen aller 35 Kulturflaschen vereinigt. Die erwartete Zellzahl betrug $2,8 \times 10^8$ Zellen. Die tatsächliche aufgereinigte Zellzahl lag schließlich bei ungefähr $5,5 \times 10^8$ Zellen.

Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation

Die Herstellung der Gesamt-RNA aus HL-60/S4 Kulturzellen erfolgte nach der von Chirgwin et al. 1979 beschriebenen Extraktionsmethode (Chirgwin, Przybyla et al. 1979). Zwei Tage nach der Induktion mit RA wurden $5,5 \times 10^8$ HL-60/S4 Suspensionszellen aus den Kulturflaschen vereinigt und für 10 Min bei 1000 UpM und 37°C sedimentiert. Die Kulturzellen wurden 2x mit 37°C warmem $1 \times$ PBS, 2 mM MgCl_2 gewaschen und dabei das Zellsediment auf vier Falcon-Tubes verteilt. Das Zellsediment wurde anschließend in je 30 ml GTC-Puffer bei Rt resuspendiert. Um die genomische DNA zu scheren wurde das Resuspensat 5x in einer sterilen 20 ml Spritze mit einer 20-gauche Kanüle aufgezogen. In acht autoklavierte SW28 Zentrifugenröhrchen waren je 8 ml CsCl -Lösung vorgelegt worden, diese mit Parafilm abgedeckt und bei 4°C vorgekühlt worden. Das CsCl wurde nun sehr langsam mit dem Zell-Lysate überschichtet ohne dabei das CsCl aufzuwirbeln und die Röhrchen für die Zentrifugation mit GTC-Puffer austariert. Für die Sedimentation der Gesamt-RNA wurde eine Beckmann L8/70 Zentrifuge mit vorgekühltem Rotor SW28

verwendet und bei 24000 UpM für 20 h bei 18°C unter langsamem Anfahr- und Brems-Modus sedimentiert. Genomische DNA sowie Proteine flottierten aufgrund ihrer Dichte auf dem CsCl-Kissen. Der ÜS wurde langsam und vorsichtig mittels einer sterilen Glaspipetten abgenommen und verworfen. Das RNA-Sediment wurde für 10 Min unter dem Abzug getrocknet und war anschließend als ein durchsichtiges Sediment am Boden der Zentrifugenröhrchen sichtbar. Dieses Sediment wurde jeweils in 400 µl steril autoklaviertem, auf 60°C vorgewärmtem TE/0,5 % SDS-Puffer resuspendiert und alle Zentrifugenröhrchen mit 1x 400 µl TE nachgespült.

Phenol-Chlorophorm-Extraktion

Das Resuspensat wurde sofort im Verhältnis 1:1 auf das vorgelegte Phenol aufgetragen, durch starkes Vortexen gut gemischt und bei 13000 UpM für 5 Min bei RT sedimentiert. Die obere wässrige Phase wurde einer zweiten Phenolextraktion unterzogen. Die proteinöse weiße Interphase der ersten Phenolextraktion wurde in TE-Puffer aufgenommen und erneut in Phenol extrahiert. Auf diese Weise wurden insgesamt je zwei Extraktionen in Phenol-, Phenol-Chloroform- und schließlich in Chloroform durchgeführt. Zur Präzipitation der Gesamt-RNA wurde 1/10 des Volumens an Natriumacetat (3 M; pH 5,4; autoklaviert) und 3 Volumenanteilen 100% Ethanol p.a. zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Die RNA wurde bei -70°C ÜN präzipitiert und konnte in dieser Form langfristig gelagert werden.

GTC-Puffer: 20 mM DTT

4 M Guanidiniumthiocyanat

25 mM Natriumcitrat; pH 7

autoklavieren oder steril filtrieren

CsCl-Lösung: 5,7 M CsCl

25 mM Natriumcitrat; pH 7,5

autoklavieren

Vorbereitung von Phenol: Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften von Phenol wurde es vor Verwendung bei 1000 UpM für 10 min sedimentiert und die wässrige Phase abgenommen. Herstellung der Phenol-Chlorophorm-Lösung: Phenol und Chlorophorm wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, für 10 min bei 1000 UpM sedimentiert und die obere wässrige Phase abgenommen.

Präzipitation der Gesamt-RNA bzw. der polyadenylierten RNA

Zur Bestimmung der OD wurden 50 µl des ethanolischen Präzipitats für 15 min bei 4°C sedimentiert. Um das Präzipitat leichter erkennen zu können, wurde vor der Zentrifugation 1 µl Glycogen oder 1-2 µl linearisiertes Acrylamid zugegeben. Das sehr kleine weißliche Sediment wurde 1x mit -20°C kaltem 70% Ethanol (100% ethanol p.a. und DEPC H₂O) überspült, der Ethanol sofort wieder abgenommen und das Sediment auf Eis unter dem Abzug getrocknet. Das Sediment wurde in 10 µl DEPC H₂O gelöst.

Bestimmung der OD von RNA

Das unmittelbar zuvor präzipitierte RNA-Sediment wurde in 10 µl DEPC H₂O aufgenommen. Mittels eines Photometers wurde die Konzentration der RNA. Dazu wurde der Quotient OD 260/280 bestimmt. Die Konzentration wurde vom Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg) direkt berechnet.

Aufreinigung der polyadenylierten RNA aus Gesamt RNA

Die Aufreinigung der polyadenylierten RNA aus Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „mRNA-Purification-Kit“ Cat. Nr. 27-9258-01 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach den Anweisungen des Hersteller Protokolls durchgeführt. Die Aufreinigung basierte auf dem Prinzip der Affinitätsaufreinigung der polyadenylierten RNA an einer mit Oligo (dT)-Cellulose bestückten Säule. Entsprechend der Bindungskapazität von 1,25 µg polyadenylierter RNA / Säule und unter der Annahme, dass etwa 2% der Gesamt-RNA polyadenylierte RNA darstellte, wurde die Säule mit 1 mg der Gesamt-RNA beladen. Dazu wurde die Gesamt-RNA zuvor für 15 min bei 4°C unter Zugabe von Glycogen präzipitiert. Nach der Säulenaufreinigung wurde die mRNA bei -80°C ÜN präzipitiert oder in dieser Form als Präzipitat langfristig gelagert. Von diesem Präzipitat wurden 2 µl für eine Gelelektrophoretische Analyse entnommen und 1 µl für die Bestimmung der Konzentration. Insgesamt konnten so aus xx mg Gesamt-RNA aus HL-60/S4 Kulturzellen 110 µg mRNA aufgereinigt werden.

Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

Die RNA wurde in 0,1 – 0,3 M Formaldehyd-Gelen, nach dem von Fournery *et al.* (1988) beschriebenen Protokoll gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aus den

Ethanolischen Präzipitaten wurden dafür 5 µg polyadenylierte RNA bzw. 20 µg Gesamt-RNA präzipitiert (siehe xxx), und in 16 µl H₂O DEPC aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl 10x RNA-Probenpuffer und 2 µl Ethidiumbromidlösung (50 µg/ml) wurden die Proben 5 min bei 68°C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt und auf das Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard wurde eine käufliche RNA-Leiter (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer, und bei konstanter Spannung von 25 V für 16 h. Das Gel sollte vor dem Beladen für 10 min bei 25 V in 1x MOPS-Puffer inkubiert worden sein. Um den Abbau der RNA durch RNAsen zu vermeiden waren Gelkammer, Schlitten und Taschen-Kamm zuvor für 1 h in 1 M autoklavierter NaOH-Lösung inkubiert worden und anschließend mit autoklaviertem Wasser gewaschen worden.

10x MOPS-Puffer: 200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 6,6 steril filtrieren, lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren

10x RNA-Probenpuffer: 0,75 ml Formamid (deionisiert)
0,15 ml 10x MOPS-Puffer
0,24 ml Formaldehyd (37%)
0,18 ml H₂O DEPC
0,1 ml Glycerin
Spatelspitze Bromphenolblau

1% Agarose-MOPS-Formaldehyd Gel:
1,5 g LE-Agarose
15 ml 10x MOPS-Puffer
130 ml H₂O autoklaviert
aufkochen und im Wasserbad auf etwa 50°C abkühlen lassen, dann 4,5 ml 37%-iges Formaldehyd zugeben.

8.14.2 Überprüfung der RNA auf Reinheit und Integrität bezügl. RNase Abbau durch „Agilent“ Kapillar-Elektrophorese

Grundlagen der „Agilent“ Kapillar-Elektrophorese

Der Agilent 2100 Bioanalyzer ist das erste kommerzielle erhältliche System das eine auf einem „Chip“ basierende Technologie benutzt um Nucleinsäuren aufzutrennen. Es ermöglicht eine schnelle und akurate Abschätzung der Qualität der RNA-Probe. Der Vorgang verläuft automatisiert und basiert auf einer visuellen Auswertung. Die „Chips“ sind aus Glas hergestellt und enthalten ein Netzwerk von miteinander verbundenen Reservoirs und Mikrokanälen, die mit einem Polymerfarbstoffmix gefüllt werden müssen. Jeder Chip enthält insgesamt 16 Vertiefungen. Drei davon werden dazu verwendet die Gel-Farbstoff-Mixtur, die aus einem linearen Polymer und einem fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoff. Eine Vertiefung wird für einen molekulare Größen-Leiter verwendet und die 12 übrigen können mit den Proben befüllt werden. Größenstandard und Proben müssen beide mit einer Marker Mixtur gemischt werden, die aus einem Puffer sowie höheren- und niedermolekularen Markern gemischt werden, die der Bioanalyzer als Referenz für die Bestimmung der Größe der Nucleinsäurefragmente benutzt. Der hochmolekulare Marker wird als Referenz benutzt um die Konzentration der DNA- bzw. RNA-Fragmente jeder Probe zu berechnen. Die Flüssigkeiten mit den Nucleinsäuren werden durch elektrische Kräfte durch die Mikrokanäle bewegt. Diese elektrischen Kräfte werden durch Elektroden erzeugt. DNA-Fragmente verschiedener Größe interkalieren mit dem mit dem Fluoreszenzfarbstoff und werden durch eine angelegte Spannung entsprechend ihrer Masse aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgt durch eine Laser-induzierte Fluoreszenz Erkennung. Der Bioanalysator kann die Daten sowohl als Grafen darstellen in denen die Wanderung der Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird, oder als computergeneriertes virtuelles Gel (**Abb.: 9**).

Durchführung der „Agilent“ Kapillar-Elektrophorese

Auf dem RNA 6000 Nanochips wurden die entsprechende Vertiefung mit 9 µl des Polymer-Farbstoff-Mix befüllt. Durch Druckerzeugung mithilfe einer 1 ml Spritze wurde der Mix in die Mikrokanäle vorangetrieben. In die Vertiefungen für die Proben wurden je 5µl Marker-Mix geladen. 1µl der Molekulargewicht Leiter wurde in

die entsprechende Vertiefung geladen und 1 µl der RNA Proben wurden in die Vertiefungen für die Proben geladen. Die Durchmischung der einzelnen Proben wurde durch Vortexen auf Stufe 4 eines Fisherbrand Vortex Genie-2 erreicht. Anschließend wurde der Chip sofort in den Bioanalyser eingegeben und mithilfe der Bioanalyzersoftware "Eucaryotic total RNA nano" oder "Eucaryotic mRNA nano" analysiert. Für die Analyse der aus HL-60/S4 Zellen gewonnenen RNA wurden 1,5 µg gesamt-RNA gelöst in 2,5 µl DEPC H₂O eingesetzt. Des weiteren wurden 1,5 µg der aufgereinigten polyadenylierten RNA geöst in DEPC H₂O eingesetzt.

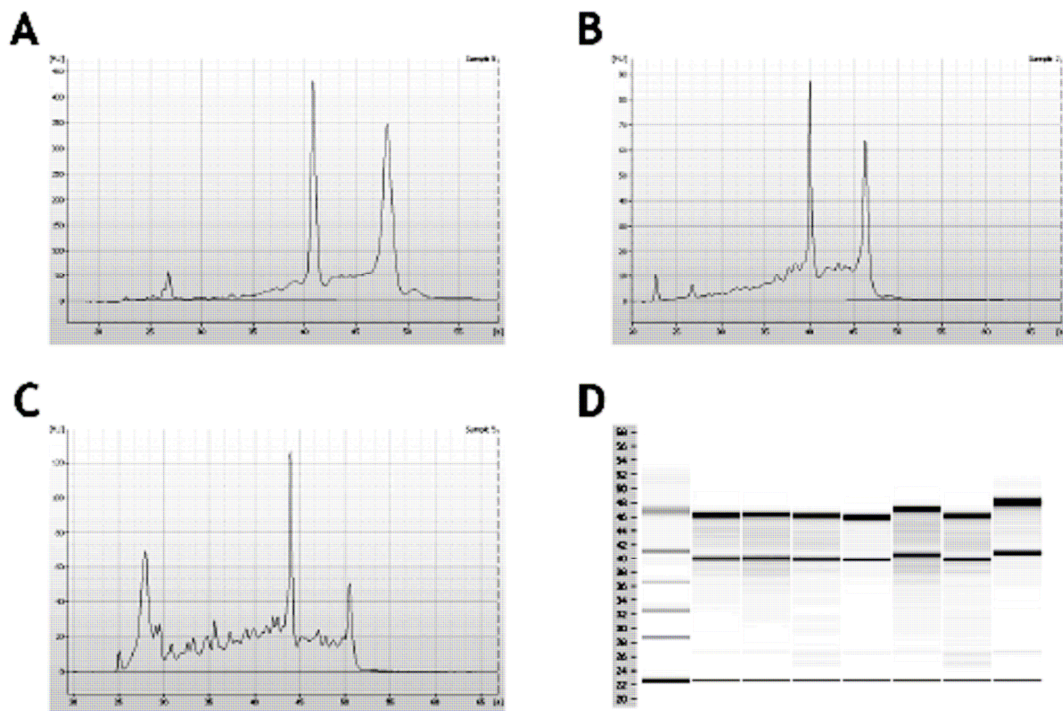


Abb.: 9 Untersuchung der Integrität von gesamt-RNA (Stratagene Universal Human Reference RNA) mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers. Die Abbildung zeigt verschiedene Laufzeit-Grafen für gesamt-RNA-Proben unterschiedlicher Qualität. A) Gesamt-RNA mit einer hohen Qualität. B) leicht degradierte gesamt-RNA. C) stark degradierte gesamt-RNA. D) Zeigt die Möglichkeit der Darstellung eines virtuellen Gels.

8.15 Proteinbiochemische Techniken

8.15.1 *Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Für die SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen wurden 10% Acrylamid Trenngele hergestellt. Zusammensetzung der Gele siehe **Tabelle 25**. Die Proteinproben wurden für 5 min in Laemmli Probenpuffer bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem Protein Größenmarker (Broad Range 7701S; New England Biolabs, Germany) auf ein Gel aufgetragen oder bei –20°C eingefroren. Die Gelelektrophorese wurde unter 25 mA ohne Begrenzung der angelegten Spannung durchgeführt. Die Methode nach Laemmli *et al.*, (1970) eignete sich für die Analyse großer Proteine, die Methode nach Thomas Kornberg *et al.*, (1975) wurde zur Auftrennung kleinerer Proteine eingesetzt (Laemmli 1970). Zumeist wurden 10%ige Lämmli-Gele oder 15%ige Kornberg-Gele verwendet. 95°C aufgeköcht und kurz bei 13000 UpM sedimentiert. Eine Spur des Gels wurde mit 10 – 20 µl der Probe beladen. Zur Analyse des Gels wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt und getrocknet oder aber die Proteine über das Nassblotverfahren auf eine PVDF-Membran transferiert.

8.15.2 *SDS-PAGE mit Tricin-Gelelen*

Für die Analyse von Protein-Fragmenten kleiner als 27 kDa eigneten sich die Tricin-Gele wegen ihrer besseren Auflösung im niedermolekularen Bereich. Diese Gele wurden in dieser Arbeit für die Auftrennung der niedermolekularen Protein-Proben aus dem GST-vermittelten Interaktionstest verwendet. Die Zusammensetzung der Trizin-Gele und des zugehörigen Laufpuffers können den folgenden Tabellen entnommen werden:

Trenngel bzw. Sammelgel	10%	20%	30%	Sammelgel
30%Acrylamid- 0.8% Bis-Stammlösung	20 ml	30 ml	40 ml	2,64 ml
Gel-Puffer (3M Tris pH 8,45)	20,73 ml	20,73 ml	20,73 ml	5,06 ml
ddH ₂ O	20,27 ml	10,27 ml	--	12,33 ml
TEMED 10%	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,2 ml
APS 10%	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,2 ml

Tabelle 26: Zusammensetzung der Tricin-Gele.

Laufpuffer:	12,11 g	Tirs HCl
	17,7 g	Tricin [N-Tris(hydroxymethyl)methyl-glycin]
	1 g	SDS
	ad 1l	ddH ₂ O

Tabelle 27: Zusammensetzung des Tricin Laufpuffers.

8.15.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde in modifizierter Form nach der von O'Farrell et al., (1975) beschriebenen Methode durchgeführt. In dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet, um die Komplexität einer aus HL-60/S4 Kulturzellen extrahierten mRNA nach Translation mit Hilfe des Retikulozytenlysatsystems (Promega, Mannheim) zu untersuchen. Die Proteine werden dabei zunächst mittels eines pH-Gradienten nach ihrer Ladung aufgetrennt und anschließend unter denaturierenden Bedingungen mittels der SDS-PAGE Methode nach ihrem Molekulargewicht.

Nichtgleichgewichts-pH-Gradientengelelektrophorese (NEPHGE)

Diese Methode eignet sich zur Auftrennung basischer Proteine. Zur Auftrennung der Proteinprobe in der ersten Dimension wurden Rundgele mit einem Durchmesser von 0,3 cm und einer Länge von etwa 13 cm verwendet. Die silikonisierten Glasröhrchen wurden am unteren Ende mit Parafilm abgedichtet, die Gelmischung luftblasenfrei eingefüllt und mit 20 µl H₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde die Oberseite der Gelröhrchen mit H₂O ausgespült und in eine Elektrophoresekammer

für Röhrchengele eingesetzt. Zur Befestigung der Gele wurde am unteren Ende ein Gaze-Netzchen befestigt. Die Proteinproben wurden mit einem Endvolumen von 100 µl in Lysis-A-Puffer aufgenommen und luftblasenfrei auf die Geloberfläche aufgetragen. Die Probe wurde bis zum oberen Rand der Röhrchen mit 2:1 in H₂O verdünntem Lysis-A-Puffer überschichtet und mit einem Tropfen 10 mM H₃PO₄-Puffer abgeschlossen. Die obere Kammer der Apparatur wurde mit 10 mM H₃PO₄-Puffer befüllt, die untere Kammer mit 20 mM NaOH. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für je 15 min bei 200 V und 300 V und wurde anschließend für 3,5 h bei 400 V fortgeführt. Dabei war die Polungsumkehrung zu beachten, so dass die obere Kammer als Anode die untere Kammer als Kathode geschaltet war. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele mit Hilfe einer wassergefüllten Spritze aus den Glasröhrchen gedrückt. Sie wurden für 20 min in O-Puffer äquilibriert und die Gelelektrophorese der zweiten Dimension unmittelbar angeschlossen.

NEPHGE-Rundgele: 5,5 g Harnstoff
1,33 ml 30% Acrylamid-Lösung
2,0 ml 10% NP-40 Lösung
2,0 ml H₂O dd
0,5 ml Ampholine pH 3,5 – 10
14 µl TEMED
20 µl 10% APS

Auftrennung der NEPHGE-Rundgele in der zweiten Dimension nach der SDS-PAGE Methode

Hierfür wurden 10%ige SDS-Midi-Gele ohne vorgeformte Taschen verwendet (Tabelle 28). Nach der Polymerisation wurden diese Gele in eine entsprechende Elektrophoresekammer eingesetzt. Die zuvor in O-Puffer äquilibrierten Rundgele wurden gleichmäßig gestreckt und luftblasenfrei auf die Oberfläche der SDS-Gele gelegt und mit heißem Einbettungspuffer eingebettet. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x Lämmli-puffer befüllt. Die Elektrophorese wurde unter 6 V / Gel ÜN oder bei 35 V / Gel durchgeführt. Im Anschluß wurden die Gele in Coomassie gefärbt und getrocknet und schließlich über ein Autoradiogramm analysiert. Die Zusammensetzung der verschiedenen Puffer kann der **Tabelle 29** entnommen werden.

	10% Trenngel	3,9% Sammelgel
30%iges Acrylamid	10 ml	1,3 ml
Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	7,5 ml	2,5 ml
DdH ₂ O	12,4 ml	6,2 ml
10% APS	0,2 ml	0,1 ml
TEMED konz.	10 µl	10 µl

Tabelle 28: Zusammensetzung des Midigels.

Lysis-A-Puffer:	9,5 M	Harnstoff
	2%	NP-40
	2%	Ampholine (0,8% pH 4-6, 0,8% pH 5-7, 0,45 pH 3-10)
O-Puffer:	60 mM	Tris/HCL pH 6,8
	2%	SDS
	20 mM	DTT
	10%	Glycerin
Überschichtungspuffer:	2:1	Lysis-A-Puffer in ddH ₂ O
Einbettungspuffer:	1%	Agarose
		O-Puffer
	Spatel- spitze	Bromphenolblau

Tabelle 29: Zusammenstzung der Puffer für die zweidimensionale Gelelektrophorese.

8.15.4 Coomassie-Färbung

Um die Proteinbanden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel für 1/2 h in einer alkoholischen Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln gefärbt. Dabei wurden die Proteine denaturiert und unter Ausbildung eines Protein-Farbstoff-Komplexes im Gel fixiert. Der überschüssige Farbstoff konnte durch Inkubation für 1 h in der sauren Coomassie-Entfärbelösung aus dem Gel herausgewaschen werden. Zur Aufbewahrung wurde das Gel in 7%ige Essigsäure

überführt und konnte anschließend zur Dokumentation eingeskannt werden oder getrocknet werden.

8.15.5 *Trocknen der SDS-Gelen zwischen Cellophan-Folie*

Das Coomassie gefärbte Gel wurde nach dem Entfärben für 10 min in 5%iger Glycerol-Lösung inkubiert. Danach wurden die Gele auf eine Cellophan-Folie aufgelegt, die kurz in 5%ige Glycerol-Lösung eingeweicht worden war und mit einer ebenso behandelten Cellophan-Folie luftblasenfrei abgedeckt. Die Folien konnten dabei entweder auf einer Glasplatte ausgelegt werden und mit Gewebeband auf derselben befestigt werden, oder aber in einer speziellen Spannvorrichtung eingespannt werden. Das Gel wurde so über Nacht bei RT unter dem Abzug getrocknet.

8.15.6 *„Enhancer“ und Trocknen von SDS-Gelen zur Erstellung eines Autoradiogramms*

Das Coomassie-Lösung gefärbt Gel wurde in 50 - 100 ml frisch zubereiteter „Enhancer“-Lösung für 2x für 15 min inkubiert. Die Gele wurden zum Trocknen auf Whatman-Papier aufgelegt, mit Folie luftblasenfrei abgedeckt und für 2 h bei 85°C in der Vakuum-Trockenapparatur getrocknet. Anschließend konnte von diesen Gelen ein Autoradiogramm erstellt werden.

Enhancerlösung: 32 g Na-Salicylat
90 ml Methanol p.a.
ad 200 ml ddH₂O

Tabelle 30: Zusammensetzung der Enhancer-Lösung.

8.15.7 *Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen („Western-Blot“-Verfahren)*

Der Transfer der Proteine wurde mittels des Naßblot-Verfahrens durchgeführt. Der Transfer selbst erfolgt elektrophoretisch, wobei die negativ geladenen Proteine im Elektrischen Feld einer Blotkammer in Richtung der Anode wandern und auf die polyvinylidenfluoride (PVDF)-Membran übertragen werden. Der Blotaufbau setzte sich wie folgt zusammen: Zwischen zwei Wasser und Ionen durchlässigen Gittern wurden zwei Schwämme gelegt, gefolgt von zwei Whatman-Papieren und der PVDF-Membran. Darauf wurde das Gel luftblasenfrei aufgelegt und durch zwei weitere

Schichten Whatman-Papier gefolgt von zwei weiteren Blotschwämmen abgedeckt. Blotschwämme und Whatmanpapier waren zuvor in 1x Boratpuffer getränkt worden. Die durch 100% Ethanol aktivierte PVDF-Membran und das SDS-Gel waren ebenfalls für 10 min in 1x Boratpuffer inkubiert worden. In der mit 1x Boratpuffer gefüllten Blotkammer verlief der Transfer bei maximaler Voltzahl während die Stromstärke schrittweise alle 5 min um 100 mA bis zu einer Endstärke von 500 mA erhöht wurde. Es folgte 1 h Inkubation bei 500 mA. Unmittelbar nach dem Transfer wurde die PVDF-Membranen für 1 min in einer Ponceau-S-Färbelösung gefärbt und mehrfach mit Wasser gespült, um die Übertragung der Proteine zu überprüfen. Diese Membran konnte nun bis zur weiteren Verwendung luftgetrocknet werden. Die vollständige Entfärbung der Membranen erfolgte in 1xTBST-Puffer.

8.15.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen nach Transfer auf eine PVDF-Membran

Die auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine konnten mit epitopspezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dazu wurde die mit Ponceau-S-Farbstoff gefärbte Membran kurz in EtOH aktiviert und in 1x TBST vollständig entfärbt. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in einer 5% Milchpulverlösung für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln oder alternativ bei 4°C über Nacht. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in 15 ml Blockierungspuffer inkubiert. Monoklonale Hybridomüberstände wurden unverdünnt eingesetzt. Dazu wurde die Membran auf eine Glasplatte aufgelegt und 1 ml des Hybridomüberstands aufgetragen. Mit einem Streifen Parafilm wurde die Membran abgedeckt und so unter leichtem Schütteln für 45 min bei RT inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch 3x Waschen für 10 min in 1x TBST-Puffer entfernt. Für die Spezies spezifischen detektion des primären Antikörpers mit einem sekundären Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelter Antikörper in geeigneten Verdünnung in 15 ml Blockierungspuffer verwendet. Nach 30 min Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei RT wurde 3x mit 1x TBST-Puffer gewaschen. Die beiden Enhanced Chemolumineszenz (ECL)-Reagenzien (NEN, Germany) wurden unmittelbar vor Verwendung in einer 1:1 Verdünnung gemischt und gleichmäßig auf die Membran aufgetragen. Nach einer 1 minütigen Inkubation wurde überschüssiges Reagenz

abgetropft, und die Membran in eine Expositions-kammer gelegt. Durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films (Kodak, Rochester New York, USA) wurden durch die Chemilumineszenz Bereiche des Films belichtet, an denen durch den Primär- und Sekundärantikörper das gewünschte Epitop erkannt worden war. Mithilfe des Proteinmarkers wurden die Epitope bezüglich ihrer Molekulargröße analysiert.

8.15.9 *In situ*- Zellfraktionierung: Cytoskelett-Präparation aus Kulturzellen

In situ- Zellfraktionierung adhärenter Zellen

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Bearbeitung einer 10 cm Gewebekulturschale mit konfluent gewachsenen Zellen. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen auf dem Schalenboden 3x durch Zugabe von 10 ml 37°C warmem Zellwaschpuffer bei RT gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt um den Abbau der Proteine durch Proteasen aus dem Zytoplasma zu vermeiden. Pro Kulturschale wurde 1 ml „Lysis-Low“-Puffer auf den Schalenboden gegeben und für 2 min inkubiert, wobei alle 30 sec der Puffer erneut durch Pipettieren vorsichtig über die Zellen gespült wurde. Anschließend wurde der gesamte Puffer wieder abgenommen, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und kurz bei 13000 UpM sedimentiert. Daraus wurde die Probe 1 erstellt indem 50 µl des ÜBs mit 2x Kornbergprobenpuffer gemischt wurden und sofort für 5 min bei 95 °C aufgeköcht wurden. Alle weiteren Proben wurden auf dieselbe Weise mit Kornbergprobenpuffer aufbereitet. Von dem auf Eis gekühlten „Lysis-High -Puffer“ wurde 1 ml auf den Schalenboden gegeben und während der 3 minütigen Inkubation alle 30 sec vorsichtig durch Pipettieren resuspendiert. Hierbei wurden, bedingt durch die erhöhte Detergenzkonzentration, die Kernmembranen lysiert und durch Zugabe von DNase und RNase die viskösen Nucleinsäuren abgebaut. Auch von dieser Fraktion wurde ein Probe von 50 µl entnommen und wie oben beschrieben aufbereitet. Pro Kulturschale wurden nun 200 µl eiskalte 5 M NaCl-Lösung zugegeben und für 3 min unter gelegentlichem Resuspendieren inkubiert. In dieser Suspension befanden sich Kernmembranen, Kernfaktoren, Hochsalz lösliche sowie Hochsalz unlösliche Komponenten. Von dieser Suspension wurde wieder eine Probe von 50 µl entnommen und wie oben beschrieben aufbereitet. Die gesamte Suspension wurde nun in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 15 min bei 13000 UpM und 4°C sedimentiert. Vom ÜB wurde erneut eine Probe entnommen.

Der restliche ÜB wurde verworfen, das Gesamt-Sediment in 50 µl Kornberg-Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen und die Probe wie oben beschrieben aufbereitet. Das Gesamt-Sediment konnte jedoch auch in 1 ml Kornberg-Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen werden. Dadurch war es möglich diese Probe mit den vorigen Proben bezüglich der Anzahl der darin aufgenommenen Zellen pro Milliliter des Lysats zu vergleichen. Die vier Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und über das Westernblot-Verfahren immunologisch analysiert.

In situ- Zellfraktionierung von Suspensionszellen

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Bearbeitung von 10×10^6 Suspensionszellen. Die Zellen wurden bei 1000 UpM für 10 min sedimentiert, in 10 ml 37°C warmem Zellwaschpuffer aufgenommen und erneut sedimentiert. Das Sediment wurde in 1 ml Zellwaschpuffer in ein Eppendorfgefäß überführt für 5 min bei 1000 UpM sedimentiert und der ÜB verworfen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in 1 ml eisgekühltem „Lysis-Low“-Puffer aufgenommen und während 2 min Inkubation alle 30 sec durch Pipettieren vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde wieder bei 1000 UpM sedimentiert und der gesamte Puffer wieder abgenommen, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und kurz bei 13000 UpM sedimentiert. Daraus wurde die Probe 1 erstellt indem 50 µl des ÜBs mit 2x Kornbergprobenpuffer gemischt wurden und sofort für 5 min bei 95 °C aufgeköcht wurden. Alle weiteren Proben wurden auf dieselbe Weise mit Kornbergprobenpuffer aufbereitet. Darauf wurden die Zellen in 1 ml eisgekühlten „Lysis-High -Puffer“ aufgenommen und während der 3 minütigen Inkubation alle 30 sec vorsichtig durch Pipettieren resuspendiert. Auch von dieser Fraktion wurde eine Probe von 50 µl entnommen. Pro Eppendorfgefäß wurden nun 200 µl eiskalte 5 M NaCl-Lösung zugegeben und für 3 min unter gelegentlichem Resuspendieren inkubiert. Von dieser Suspension wurde wieder eine Probe von 50 µl entnommen. Die gesamte Suspension wurde nun in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 15 min bei 13000 UpM und 4°C sedimentiert. Vom ÜB wurde erneut eine Probe entnommen. Der restliche ÜB wurde verworfen, das Gesamt-Sediment in 50 µl bzw. 1 ml Kornbergprobenpuffer-Urea aufgenommen und die Probe wie oben beschrieben aufbereitet. Die vier Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und über das Westernblot-Verfahren immunologisch analysiert.

	Lysis-Low-Puffer	Lysis-High-Puffer
10 x PBS	0,5 ml	0,5 ml
MOPS 0,5 mM	1 ml	1 ml
EGTA 0,1 mM	100 µl	--
MgCl ₂ 1 M	100 µl	100 µl
NP-40 10%	200 µl	1 ml
PMSF 1 mg / 15 µl	75 µl	75 µl
RNase (10 mg/ml)	--	10 µl
DNase (50 mg/ml)	--	50 µl
ddH ₂ O	ad 10 ml	ad 10 ml

Tabelle 31: Zusammensetzung der Puffer Lysis-Low und Lysis-High.

Kornberg-Harnstoff-Probenpuffer:	600 µg	Urea
	600 µl	2x Kornberg- Probenpuffer
	500 µl	ddH ₂ O

Tabelle 32: Zusammensetzung des Kornberg-Harnstoff-Probenpuffers.

8.15.10 Protein-Translation mit Hilfe des TNT-Retikulozyten-Lysat-Systems

Unter Verwendung von ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein konnten mit Hilfe der *in vitro* Translations-Methode ³⁵S markierte Proteine hergestellt werden wie sie für die GST-vermittelten Interaktionstests eingesetzt wurden. Wurde mRNA als Ausgangsmaterial für die *in vitro* Translation verwendet, wurde das einfache TNT-Reticulozyten-Lysat-System (Promega, Mannheim) verwendet. Wurde jedoch cDNA als Ausgangsmaterial für die *in vitro* Translation verwendet, eignete sich dafür das gekoppelte TNT-Reticulozyten-Lysat-System (Promega, Mannheim). Hierbei konnte die Transkription in mRNA gefolgt von der Translation in Protein in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Jeweils ½ des vom hersteller empfohlenen Translationsansatz wurde nach den Angaben der Hersteller in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt. Anschließend wurde der Versuchsansatz für 90 min bei 30°C inkubiert und so fort weiterverarbeitet.

8.15.11 Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

Ermittlung eines stark exprimierenden Bakterienklones

Zunächst wurden die in den beiden Y2H-Ansätzen verwendeten cDNA-Fragmente der Proteine LBR, LMNA in den GST-Vector pGEX4T1-(+NcoI) (Amersham Pharmacia, Freiburg modifiziert durch Dr. A. König (siehe Dissertation)) einkloniert. Diese durch Sequenzierung überprüften Konstrukte wurden im Folgenden in den durch IPTG induzierbaren Bakterienstamm BL21(DE3) transformiert. Um einen möglichst stark exprimierenden Bakterienklon zu ermitteln wurden pro Konstrukt je drei bis vier Bakterienkolonien auf ihre Expression des GST-Fusionsproteins überprüft. Dazu wurde zunächst eine 2 ml ÜN-Kultur in Ampizillin haltigem LB-Medium mit je einem Klon angeimpft und bei 37°C bei 250 UpM über Nacht inkubiert. Diese Kulturen wurden in 7 ml des Ampicillin haltigen LB-Mediums bis zu einer $OD_{600} = 0,2 - 0,3$ verdünnt und für etwa 1 h bei 37°C und 250 UpM bis zu einer $OD_{595} = 0,6 - 0,9$ heranwachsen gelassen. Nach der Induktion der Bakterien mit 1 mM bzw. 2 mM Isopropyl-thiogalactosid (IPTG) wurden die Kulturen für weitere 2 - 4 h bei 37°C und 250 UpM inkubiert. Um später die optimalen Wachstumsdauer zu ermitteln, wurden alle 1 – 2 h während der Inkubation Proben entnommen dazu wurden je 60 µl der Bakteriensuspension mit 30 µl 3x Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Diese Proben wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und im Naßblottverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Unter Verwendung spezifischer Antikörper für GST und wenn möglich auch für die jeweiligen GST-Fusionsproteine wurden die erhaltenen Fusions-Proteine analysiert. Anhand des Protein-Markers konnten die Größen der GST-Fusionsproteine bestimmt und mit den zuvor berechneten Proteingrößen verglichen werden. Von den Kulturen mit einer $OD_{600} = 0,8 - 0,9$ waren jeweils 400 µl als 25%iger Glycerolstock bei – 80°C eingefroren worden, um zu einem späteren Zeitpunkt zum Animpfen von Medium für die Proteinherstellung im großen Maßstab zur Verfügung zu stehen.

Herstellung des rekombinanten GST-Fusionsproteins

Nachdem ein Bakterienklon mit starker Expression des GST-Fusionsproteins bestimmt worden war wurden 200 ml des Ampizillin haltigen LB-Mediums für eine ÜN-Kultur mit dem Glycerolstock des gewünschten Klones angeimpft. Mit dieser ÜN-

kultur wurden am folgenden Tag 400 ml Ampzillin haltiges LB-Medium angeimpft. Die OD_{600} sollte bei 0,2 – 0,3 liegen. Nach etwa 1 - 2 h befand sich die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer $OD_{600} = 0,8 - 0,9$. Durch Zugabe von 1 – 2 mM IPTG konnte die Expression des GST-Fusions-Proteins induziert werden. Vor der Induktion und 2 - 4 h nach der Inkubation wurde jeweils 50 µl Proben der Kultur entnommen, die mit 3x-Lämmli-Probenpuffer versetzt bei 95°C für 10 min aufgekocht wurden. Die Bakteriensuspension wurde darauf in einer auf 4°C vorgekühlten Beckmann Zentrifuge in einem vorgekühlten JA 10 Rotor sedimentiert. Der ÜB wurde verworfen, das Sediment in 7 ml Aufschlusspuffer gut resuspendiert und in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 ml frisch angesetzter Lysozym-Sotcklösung wurde das Resuspensat für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 40 µl 1 M DTT, 40 µl einer gesättigten PMSF-Lösung und 350 µl einer 10%igen N-Lauryl-Sarcosin-Lösung zugegeben. Die Lyse der Bakterien erfolgte mit Hilfe des Ultraschall-Homogenisators Sonoplus HD2070 (Bandelin, Berlin) mit 100% der möglichen Leistung. Es wurde 3x je 1 min auf Eis beschallt mit jeweils 1 minütiger Unterbrechung zur Abkühlung des Lysates. Die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 18000 UpM wurde in einer auf 4°C vorgekühlten Beckmann Zentrifuge in einem JA 25 ½ durchgeführt. Der Überstand wurde in ein neues SS34 Zentrifugenröhrchen überführt und 1 ml 10%ige Triton-X100-Lösung zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei 4°C bei 40 UpM wurde das Sonifikat erneut für 20 min bei 18000 UpM bei 4°C sedimentiert. Im Anschluß daran wurde der ÜB durch einen 0,22 µm Poren Filter (Millipore, Malsheim France) filtriert und davon eine 50 µl Probe entnommen. Bis zur weiteren Aufreinigung wurde das Sonifikat bei – 80°C gelagert.

Aufschlusspuffer:	10 mM	Tris pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Lysozyme-Sotcklösung:	10 mg / ml in ddH ₂ O	Lysozyme (Roche, Mannheim)
PMSF-Lösung gesättigt:	1 µg / 15 µl EtOH	Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma,
	p.a.	Steinheim)
N-Lauryl-Sarcosin-Lösung:	10%ige Lösung	(Roche, Mannheim)
IPTG-Stocklösung	100 mM	Isopropyl-thiogalactosid (IPTG) (Roche,
Stocklösung:		Mannheim)

Aufreinigung des rekombinanten GST-Fusionsproteins

Um die GST-Fusions-Proteine im Lysat anzureichern und gleichzeitig störende Bakterienproteine zu entfernen, wurde das Bakterien-Sonifikat über eine GST-Sepharose Säulenmatrix aufgereinigt. Hierzu wurde der GST-Puffer-Kit von Novagen / Merck, Darmstadt verwendet. Alle verwendeten Puffer wurden mittels eines 0,22 µl Poren Filters filtriert und bei RT bereitgestellt. Die Säule wurde mit 1 ml der Säulenmatrix- Suspension beladen und darauf mit 5 ml Aufschlusspuffer äquilibriert. Anschließend wurde das gesamte filtrierte Sonifikat auf die Säule aufgetragen, Der Durchfluß wurde in einem 15 ml Gefäß auf Eis aufgefangen und bis zur erneuten Aufreinigung bei – 80°C gelagert. Von diesem Durchfluß wurde eine 10 µl Probe entnommen und mit Kornberg-Probenpuffer versetzt. Die Säule wurde mit 15 ml 1x GST-Waschpuffer gewaschen und das Fusionsprotein 4x mit je 1 ml 1x Glutathion-Elutionspuffer eluiert. Von diesen vier Fraktionen wurden ebenfalls 10 µl Proben entnommen. Der Proteingehalt der Proben wurde anhand der Blaufärbung einer Bio-Rad-Lösung abgeschätzt. Anschließend wurden die Proben mit der höchsten Konzentration vereinigt. Aus dem Eluat wurde das Glutathion durch Dialyse entfernt. Hierzu wurden Dialyseschläuche (Serva, Heidelberg) verwendet mit einer Durchlässigkeit für Proteine mit einem Molekulargewicht von 0-25000 Da. Bevor die Schläuche verwendet werden konnten mussten sie für 10 min in H₂O gekocht werden und wurden anschließend in Ethanol mit Acid bei 4°C gelagert. Vor der Dialyse wurden die Schläuche mit Dialysepuffer durchgespült und für 10 min darin äquilibriert. Von einer Seite wurden die Schläuche mit einer Klemme verschlossen, und erneut mit Dialysepuffer gespült und mit den Proteinlösungen der vereinigten Fraktionen beladen. Die Dialyse erfolgte insgesamt in 3 l Dialysepuffer, wobei der Dialyseschlauch 6x in je 500 ml frischem Dialysepuffer für 30 min unter leichtem Rühren inkubiert wurde. Auf diese Weise wurde das Glutathion langsam heraus dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Auch nach der Dialyse wurde eine Probe entnommen und zusammen mit den bei der Aufreinigung gewonnen Proben über die SDS-PAGE analysiert. Die Coomassie-Brilliant-Blue gefärbten Gele zeigten die Anreicherung des aufgereinigten Proteins und konnten Proteaseabbau ausschließen.

8.15.12 GST-vermittelter Interaktionstest

Je 200 µl der ethanolischen GST-bindenden-Sepharosesuspension (GST Bind Resin, Novagen/Merck, Darmstadt) wurden 3x mit 1xPBS gewaschen. Diese Suspension wurde für 2,5 h mit etwa 10 ml des filtrierten Bakterien-Lysats des GST-Fusionsproteins bei 4°C rotierend inkubiert. Die Suspension wurde bei 1000 UpM für 5 min sedimentiert, der ÜS abgenommen und erneut bei – 80°C eingefroren. Die Sepharose-Kügelchen wurden in 1xPBS aufgenommen, 3x in 1xPBS gewaschen und wurden schließlich 1:1 in 1x PBS aufgenommen und entweder für wenige Tage bei 4°C gelagert oder in 20 µl Aliquots bei –80°C gelagert. Um die Menge des geladenen Proteins abschätzen zu können wurden 10 µl der Suspension über ein 10%iges SDS-PAGE analysiert. Anhand des Agarosegels konnte der nötige Verdünnungsfaktor abgeschätzt werden. Die GST-Kontrolle wurde im Verhältnis 1:1 zum GST-Fusionsprotein eingesetzt. Es wurde entweder mit 1x PBS verdünnt oder aber ungebundene GST-Sepharose-Kügelchen zugegeben. Für den eigentlichen Pulldown-Versuch wurden sowohl von den mit GST beladenen Kügelchen als auch von den mit GST-Fusionsprotein beladenen Kügelchen jeweils 10 – 20 µl der Suspension 1x mit dem Bindungs-Puffer gewaschen, und dann in 200 µl des Bindungs-Puffers aufgenommen. Zu dieser Suspension wurden 20 µl des kurz zuvor erstellten Reitkulozytenlysats Ansatzes gegeben und für 2,5 h unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und es folgten vier Waschschriffe mit jeweils 400 µl des Bindungs-Puffers. Beim dritten und vierten Waschschriff wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Die Sepharose- Kügelchen wurden nun in 15 µl 3x Lämmli-Puffer resuspendiert, bei 95°C für 5 min aufgeköcht und mit der Sepharose auf ein 10%iges SDS-Agarose-Gel aufgetragen. Für sehr kleine Konstrukte wurden die in niedermolekularen Bereichen Tricin-Gele verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine im Naßblotverfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und nach 1 h Trocknung unter dem Abzug ein Autoradiogramm erstellt.

Bindugs-Puffer-HEPES:	20 mM	HEPES pH 7,4 steril filtriert
	150 mM	NaCl
	10%	Glycerol
	0,05%	NP-40
	ad	DdH2O
Bindugs-Puffer ΔX:	50 mM	Tirs-HCl, pH 8
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,5%	NP-40
	ad	ddH2O

Tabelle 33: Zusammensetzung der Bindungspuffer.

8.15.13 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Proteinlösung wurde nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurde ein Fertigreagenz (Bio Rad, München) 1:5 mit ddH₂O verdünnt. In der Regel wurden 5 - 10 µl der zu analysierenden Proteinlösung zu 1 ml der verdünnten Bio Rad-Lösung gegeben und deren OD bei 595 nm photometrisch im Vergleich zu einer Standardlösung bestimmt. Anhand einer zuvor erstellten Eichgeraden, die mit Hilfe einer Rinderserumalbumin-Lösung bekannter Konzentration erstellt worden war die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben, bestimmt werden.

8.16 Zellkultur Techniken

8.16.1 Kultivieren und Passagieren von Kulturzellen

Passagieren von andhärenten Kulturzelllinien

Die für diese Arbeit verwendeten Kulturzellen wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Dazu wurden die Zellen in DMEM mit 10% FCS und 20 mM L-Glutamin-Medium in Kulturschalen (Becton-Dickinson, Heidelberg) passagiert. Durch Teilen und erneutes Aussäen in der geeigneten Verdünnung wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Zum Passagieren einer konfluent mit Zellen bewachsenen Kulturschale wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen durch Zugabe von 3 ml 37°C warmem 1x PBS/EDTA gewaschen. Anschließend wurden 3 ml 37°C warme

Trypsin-Lösung zugegeben und bis auf etwa 200 µl wieder abgenommen. Die Zellen wurden vom Schalenboden durch 3-5 min Inkubation bei 37°C gelöst. Diese Zellsuspension wurde in einer geeigneten Verdünnung in neue Kulturschalen, mit frischem Medium ausgesät.

Passagieren von Suspensionzelllinien

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinie HL-60/S4 wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Dazu wurden die Zellen in RPMI-Medium mit 10 % FKS, 1 % Glutamin und 1% Pen/Strep in 25 cm², 75 cm² oder 175cm² oder Kulturflaschen (Becton Dickinson, N.J. USA) kultiviert. Das Passagieren dieser Zelllinie erfolgte durch Verdünnung von 1 ml der Zellsuspension in einer entsprechenden Menge frischem 37°C warmem Medium. Dabei wurden die Zellen in der Regel nach etwa 2-3 Tagen in frischem Medium auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml verdünnt. Gelegentlich wurden auch stärkere Verdünnungen eingesetzt. Die Zelldichte vor der Teilung sollte jedoch 2×10^6 Zellen/ml nicht überschreiten.

8.16.2 Einfrieren von Gewebekulturzellen und Suspensionszellen

Zur Langzeitlagerung von Gewebekulturzellen wurden die Zellen bei –80°C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die konfluenten Zellen einer 60 mm-Kulturschale mit PBS/EDTA gewaschen, trypsinisiert und in 1,6 ml DMEM/FKS/Glutamin resuspendiert und für 5 min bei 1000 UpM sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1,5 ml DMEM/FKS/Glutamin resuspendiert wurde in 2 ml Einfrierröhrchen mit Schraubverschluß (Nunc, Wiesbaden), in die 150 µl DMSO vorgelegt worden war, überführt und gut gemischt. Nach der Inkubation für 30 min bei –20°C wurden sie schließlich bei –80°C oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Auch Suspensionszellen konnten auf diese Weise tiefgefroren werden. Dazu wurde die Zellen einer 175 cm² Kulturflasche mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml bei 1000 UpM für 10 min sedimentiert und in 1,4 ml 37°C RPMI/FKS/PenStrep/Glutamin-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde in 2 ml Einfrierröhrchen mit Schraubverschluß (Nunc, Wiesbaden) in die 150 µl DMSO vorgelegt worden war überführt und gut gemischt. Die Röhrchen wurden zunächst für 30 min bei –20°C eingefroren, und schließlich bei – 80°C tiefgefroren oder in flüssigen Stickstoff überführt werden.

8.16.3 *Auftauen von Kulturzellen*

Die Einfrierröhrchen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 10 ml 37°C warmem DMEM/FKS/Glutamin-Medium in 50 ml Falcon Röhrchen überführt, die Suspensionszellen in 10 ml RPMI/FKS/PenStrep/Glutamin-Medium und bei 1000 UpM für 5 min, die Suspensionszellen für 10 min sedimentiert. Das Sediment wurde in 5 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und die gesamte Zellsuspension in 60 mm-Kulturschalen bzw. Kulturflaschen ausgesät und anschließend bei Standardbedingungen kultiviert.

8.16.4 *Differenzierung von HL-60 Zellen durch Retinsäure (RA) oder Tetrathorbolester (TPA)*

Die humane promyeloide Zelllinien HL-60 und HL-60/S4 konnten durch Zugabe von all trans Retinsäure (RA) bzw. zur Differenzierung zu Granulozyten angeregt werden, durch Zugabe von Tetrathorbolester (TPA) zur Differenzierung zu Makrophagen. Fünf Tagen nach der Induktion gingen die Zellen natürlicherweise in Apoptose über. Die RA wurde den Zellen in Form einer 1 mM ethanolischen Lösung zugeführt. Sie wurde der Zellsuspension mit einem Verdünnungsfaktor von 1:1000 zugegeben. Dabei wurde die entsprechende Menge der ethanolischen RA-Lösung zunächst mit 200 µl Medium vermischt und dieser Ansatz mit einer sterilen mit Watte gestopften Pasteurpipette in die Zellsuspension überführt. Zum Schutz vor Licht induziertem Zerfall der RA wurden die Stocklösung zu je 200 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und diese mit Aluminiumfolie umwickelt. Vor der Verabreichung der RA wurden auch die Kulturflaschen mit der Zellsuspension mit Aluminiumfolie Licht dicht umwickelt. Die induzierten Zellen wurden im Folgenden weiter unter Standardbedingungen kultiviert.

8.17 Hefe Techniken

8.17.1 *Kultivieren und Passagieren von Hefezellen*

Zur Kultivierung von Hefezellen wurden diese auf Agarose-Nährmedienplatten mit den für den jeweiligen Hefeklon geeigneten Selektionseigenschaften bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Alle zwei bis drei Tage sollte die Hefekolonie auf eine neue Nährmedienplatte überführt werden um so das optimale Wachstum zu gewährleisten.

Passagieren der reinen Hefestämme AH109, AH109 pGBKT7–T1 und Y187-p53:

Mit Hilfe einer sterilen Einweg-Impfschlinge wurde ein Teil der Gesamtkolonie von der Nährmedienplatte in 200 µl des entsprechenden Selektionsmediums überführt. Durch starkes Vortexen wurden die Hefezellen gut resuspendiert und die gesamte Lösung in mehreren Tropfen auf eine Nährmedienplatte mit geeigneten Selektionseigenschaften aufgetropft.

Passagieren eines frischen Einzelklons z.B. nach der Transfektion eines reinen Hefestammes:

Mit Hilfe einer sterilen Einweg-Impfnadel wurde der gesamte Klon von etwa 2-3 mm Durchmesser von der Nährmedienplatte abgenommen, in 10 µl des entsprechenden Selektionsmediums resuspendiert und auf eine Nährmedienplatte mit geeigneten Selektionseigenschaften aufgetropft. Nach dem vollständig einsickern des Mediums, wurde die Platte über Kopf bei 30°C für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach konnte eine solche Platte für ca. 3-4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Bevor diese Klone erneut für ein Experiment eingesetzt wurden, mussten sie durch mehrmaliges Passagieren wieder in Kultur genommen werden. Zur langfristigen Lagerung wurden die Hefeklone als Glycerolstocks bei - 80°C eingefroren.

8.17.2 Einfrieren von Hefezellen als 25 % Glycerolstock und Auftauen

Hefezellen eines gewünschten Klons wurden von der Nährmedienplatte in ein Einfrierröhrchen mit Schraubverschluss (Nunc, Wiesbaden) in 250 µl des Mediums mit den geeigneten Selektionseigenschaften überführt und durch Vortexen gut resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 250 µl von einer sterilen 50% Glycerollösung zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Die Einfrierröhrchen wurden kurze Zeit auf Eis zwischengelagert und von da schnellst möglich auf bei - 80°C eingefroren. Um den Glycerolstocks wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Einfrierröhrchen bei 37°C aufgetaut, die Hefezellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sofort bei 3000 UpM sedimentiert. Der ÜS wurde verworfen, das Zellsediment in 10 – 20 µl des Mediums mit den geeigneten Selektionseigenschaften resuspendiert und wieder auf eine geeigneten Nährmedienplatte aufgetropft. Die Hefezellen sollten während einer Inkubation von 2-3 Tagen bei 30°C im Brutschrank wieder zu Kolonien heranwachsen.

8.17.3 Inokulation von Flüssigmedien

Die jeweils benötigte Menge Flüssigmedium mit den geeigneten Selektionseigenschaften wurde auf 30°C vorgewärmt. Mittels einer sterilen Einweg-Impfschlinge wurde ein Einzelklon von der Nährmedieinplatte in 200 µl des Mediums überführt und durch Vortexen gut resuspendiert. Der dazu verwendete Einzelklon sollte einen Durchmesser von 2-3 mm haben und nicht länger als 2-3 Tage zuvor passagiert worden sein. Diese Suspension in die Gesamtmenge des Mediums überführt und über Nacht bei 30°C und 250 UpM bis zur gewünschten Dichte bei OD₆₀₀ angereichert.

8.17.4 Herstellung von kompetenten Hefezellen

Zur Transformation von Hefezellen des reinen AH109 Stammes (Clontech, Heidelberg) wurde zunächst eine Flüssigkultur von 50 ml YPDA-Medium dieses Stammes angesetzt, die bei 30°C und 250 UpM für 16 - 20 h bis zu einer OD₆₀₀ von 1 – 1,5 herangewachsen sein sollte. Für Hefestämme die bereits mit Konstrukten der Vektoren pGBKT7 oder pGADT7-Rec (Clontech, Heidelberg) transformiert worden waren, wurde Medium mit den entsprechenden Selektionseigenschaften verwendet. Mit dieser Kultur wurden im Folgenden 300 ml des auf 30°C vorgewärmten YPDA-Mediums angeimpft so dass eine OD₆₀₀ zwischen 0,2 – 0,3 erreicht wurde. Nach 3 – 4 h bei 30°C und 250 UpM wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase bei OD OD₆₀₀ zwischen 0,6 – 0,8 geerntet. Diese Kultur wurde für 5 min bei 1000xg bei RT sedimentiert, der ÜS verworfen und das Sediment in insgesamt 40 ml sterilem 1x TE-Puffer durch Pipettieren gewaschen um danach erneut für 5 min bei 1000xg bei RT sedimentiert zu werden. Dieses Sediment wurde in 1,5 ml frisch zubereitetem sterilem 1x TE/LiAc-Puffer resuspendiert. Die auf diese Weise erhaltenen kompetenten Hefezellen waren ausreichend für 12-14 Transformationsansätze. Sie konnten innerhalb einer Stunde für die Transformation eingesetzt werden.

8.17.5 Transformation von kompetenten Hefezellen

Die kompetenten Hefezellen wurden möglichst unmittelbar nachdem sie in LiAc-TE resuspendiert wurden zur Transformation verwendet. Der Transformationsansatz setzte sich aus je 10 µl der zu transfizierenden Plasmid-DNA-Konstrukten mit 10

ng/µl und 10 µl Herringsperm-DNA mit 10 mg/ml (Clontech, Heidelberg) als „Carrier“-DNA zusammen. Diese „Carrier“-DNA war zuvor 20 min bei 100°C aufgeköcht worden und anschließend sofort für mindestens 2 min auf Eis inkubiert worden. Zu diesen Ansätzen wurden je 100 µl der kompetenten Hefezellen zugegeben und mit 600 µl frisch zubereiteter 1x PEG/LiAc-Lösung durch 10 s Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 30°C und 200 UpM inkubiert. Es folgte die Zugabe von jeweils 70 µl DMSO zur Aufweichung der Zellmembranen. Die Ansätze vorsichtig durch 3x Invertieren gemischt und für 15 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Nachdem die Hefezellen dann für 2 min auf Eis inkubiert worden waren, wurden sie bei 13000 UpM für 5 sec sedimentiert. Das DMSO enthaltende Medium wurde nun möglichst schnell abgenommen und die Zellen in 500 µl sterilem 1x TE resuspendiert. Von diesem Ansatzes wurden 100 µl direkt auf eine Nährmedienplatte mit den entsprechenden Selektionseigenschaften ausplattiert. Um die Verteilungsdichte der Einzelklone zu verringern, wurden auch Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 ausplattiert. Zum Ausplattieren wurden sterile 5 mm Glaskugeln (Schott, Mainz) verwendet. Nach einer Inkubation von 3-5 Tagen bei 30°C im Brutschrank sollten Einzelklone der transformierten Hefezellen herangewachsen sein.

10x TE-Puffer (pH 7,5):	0,1 M	Tris-HCl
	10 mM	EDTA, pH 7,5
10x Lithiumacetat-Lösung:	1 M	Lithiumacetat (Sigma L-6883)
		in ddH ₂ O
		Autoklavieren
1x TE-Lithiumacetat-Lösung:	8 ml	ddH ₂ O
(frisch ansetzen)	1 ml	10x TE-Puffer
	1 ml	10x Lithiumacetat-Lösung
50 % Polyethylenglycol (PEG)-Lösung:	50 %	PEG (Sigma P-3640, Taufkirchen)
		in ddH ₂ O
PEG-Lithiumacetat-Lösung :	1 M	Lithiumacetat (Sigma L-6883, Taufkirchen)
		in ddH ₂ O
		Autoklavieren
1x PEG-TE-Lithiumacetat-Lösung:	8 ml	50 % PEG
(frisch ansetzen)	1 ml	10x TE-Puffer
	1 ml	10x Lithiumacetat-Lösung

Tabelle 34: Lösungen zur Transformation von Hefezellen.

8.17.6 Toxizitätstest

8.17.7 Cotransformation einer cDNA Bibliothek in einen Hefestamm

Um nach dem Yeast two-hybrid Prinzip eine Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek durchzuführen wurde diese in einen mit dem Fänger-Konstrukt vortransformierten Hefestamm cotransformiert. Dazu wurden zur homologen Rekombination geeignete Fragmente einer cDNA-Bibliothek verwendet. Zur Cotransformation wurden vortransformierte AH109 Hefezellen verwendet, die den pGBKT7 Fänger-Vektor mit dem N-terminus von LBR (AS 1-210) enthielten. Unmittelbar vor der Cotransformation wurde ein 300 ml Flüssigkulturansatz dieser Zellen mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode kompetent gemacht. Anschließend wurden die kurz zuvor aus der ethanolischen Lösung präzipitierte cDNA-Bibliothek-Fragmente zusammen mit dem Vektor „pGADT7-Rec Sma linearized“ (BD Clontech, Heidelberg) in die kompetenten Zellen transformiert. Der Transformationsansatz war wie folgt zusammengestellt: Zu 20 µl der cDNA mit einer Konzentration von 100-200 ng/µl wurden 6 µl des Vectors pGADT7-Rec Sma linearized mit einer Konzentration von (0,5 µg / µl) zugegeben und mit 20 µl der zuvor 20 min bei 100°C denaturierten „Herring Sperm Carrier DNA“ gut vermischt. Dazu wurden 600 µl der kompetenten Zellen gegeben und durch sanftes Vortexen mit der DNA vermischt. Von einer frisch angestzten PEG/LiAc Lösung wurden 2,5 ml zugegeben und erneut durch sanftes Vortexen gemischt. Dieser Ansatz wurde für 45 min bei 30°C im Brutschrank inkubiert und alle 15 Minuten erneut durchmischt. Anschließend wurden 160 µl DMSO zugegeben, vorsichtig durchmischt ohne zu vortexen und für 20 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Inkubation wurde der Ansatz alle 10 Minuten erneut durchmischt. Die Zellen konnten nun bei 700 xg für 5 min sedimentiert werden und in 3 ml YPD Plus Liquid medium aufgenommen werden. Darauf wurde der Ansatz für 90 min bei 30°C und 200 UpM inkubiert und danach erneut bei 700 xg für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 6 ml 0,9% NaCl-Lösung (BD Clontech, Heidelberg) resuspendiert. Zur späteren Berechnung der Transformationseffizienz wurden von diesem Ansatz 30 µl der Zellsuspension in 720 µl der 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert. Davon wurden je 150 µl auf 100 mm Platten mit den Selektionseigenschaften SD –Leu/ -Trp sowie SD –Leu ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zu je 150 µl auf etwa 40 150 mm

Nährmedienplatten mit den Selektionseigenschaften SD –Ade/ –His/ –Leu/ –Trp ausplattiert. Zum Ausplattieren wurden sterile 5 mm Glaskugeln verwendet. Die Nährmedienplatten wurden nun bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Um die Platten während der 3-5wöchigen Inkubationszeit vor dem Austrocknen zu schützen wurden zwischen die gestapelten Platten nasse Papiertücher gelegt und die Plattenstapel in Plastiktüten verpackt ohne dabei den Gasaustausch zu unterbinden. Nach etwa zwei Wochen waren die ersten Klone zu etwa 2-3 mm großen Plaques herangewachsen. Mit Hilfe einer sterilen Impfschlinge wurden diese Klone auf eine SD –Ade/ –His/ –Leu/ –Trp Nährmedienplatte übertragen und von dort jeweils nach zwei Tagen weitere vier mal passagiert. Nach etwa fünf bis sechs Wochen konnten keine neuen Klone mehr geerntet werden. Von jedem der geernteten Klonen wurden Glycerolstocks in SD –Ade/ –His/ –Leu/ –Trp Nährmedium hergestellt. Die Verifizierung der Interaktion der Fänger- und „prey“-Proteine wurde zum einen über den β -Galactosidase Filter Test sowie biochemische Analysen vorgenommen.

8.17.8 Berechnung der Transformationseffizienz

Fünf Tagen nach dem Ausplattieren des Cotransformationsansatzes wurden die Klone auf den SD –Leu/ –Trp sowie SD –Leu Kontroll-Nährmedienplatten ausgezählt. Die Transformationseffizienz konnte nach der folgenden Formel berechnet werden. Die Anzahl der Kolonien auf der SD/-Leu Nährmedienplatte x 1000 = transformierte Zellen / 3 μ g pGADT7-Rec vector. Das Ergebnis sollte $> 1 \times 10^6$ / 3 μ g pGADT7-Rec sein. Die Anzahl der Kolonien auf der SD/-Leu/-Trp Nährmedienplatte x 1000 = Anzahl der transformierten Hefezellen / 3 μ g pGADT7-Rec Vektor. Das Ergebnis sollte $> 5 \times 10^5$ sein.

8.17.9 Konstitutive Untersuchung von Protein Interaktionen durch Cotransformation

Sollte der Hefestamm AH109 konstitutiv mit zwei cDNA-Konstrukten transformiert werden um gezielt die Interaktion zweier Proteine oder Proteinfragmente zu untersuchen, konnte diese Transformation in ein oder zwei Schritten durchgeführt werden. Eine Zweittransformation des mit dem Fänger-Konstrukt vortransformierten Stammes AH109 wurde wie für bereits unter „Transformation eines Hefestammes“ beschrieben durchgeführt. Dabei wurden anstelle des untransformierten

Hefestammes AH109 Hefezellen, die mit dem ersten Konstrukt vortransformierten waren, verwendet.

8.17.10 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Zur Identifizierung eines Hefeklons mit starker Expression des transformierten Fänger-Proteins wurde die Proteinmenge bestimmt. Dazu wurden aus 4-6 Klonen Proteinextrakte aus vergleichbaren Zellmengen hergestellt und die Proteinmenge anschließend über das Western-Blott-Verfahren mit anschließender Immunantikörperfärbung analysiert. Zunächst wurden von 4-6 der mit dem Fänger-Konstrukt transformierten Einzelklone 5 ml Flüssigkulturen angesetzt und über Nacht bei 30°C und 250 RpM inkubiert. Die dazu verwendete n Einzelkolonien sollten einen Durchmesser von 2-3 mm besitzen und nicht älter als 2-3 Tage sein. Als Kontrolle wurde eine Kolonie des nicht transformierten Stammes AH109 mitgeführt. Jeder der über Nacht gewachsenen Flüssigkulturen wurden nun mit 45 ml frischem Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 verdünnt und bei 30°C und 250 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Gesamt-OD₆₀₀-Einheiten der Kultur wurde erhalten indem die OD₆₀₀ für 1 ml der Kultur mit dem Gesamtvolumen der Kultur multipliziert wurde (z.B. 0,6 x 55 ml = 33 OD₆₀₀-Einheiten). Diese Kultur wurde in eisgekühlten Zentrifugenröhrchen bei 4°C für 5 min bei 1000 UpM sedimentiert und das Sediment anschließend in eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Nach erneutem Sedimentieren bei 4°C für 5 min bei 1000 UpM wurde das Sediment in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei – 80°C eingefroren. Um die Zellmembranen der Hefezellen aufzubrechen wurde das tiefgefrorene Sediment nach Zugabe des 60°C heißen „Cracking“-Puffer unverzüglich für 2 min im 60°C Wasserbad inkubiert. Dafür wurden 100 µl des komplett „Cracking“-Puffers pro 7,5 OD₆₀₀-Einheiten eingesetzt. Um zelleigener Proteasaktivität entgegenzuwirken wurde alle 7 min erneut 1µl PMSF /100µl „Cracking“-Puffer zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 80 µg Glaskügelchen pro 7,4 OD-Einheiten überführt. Die Zellmembranen konnten durch 10 min Erhitzen bei 70°C im Wasserbad gefolgt von 1 min intensivem Vortexen aufgebrochen werden. Nach 5 min Sedimentieren bei 4°C und 13000 UpM wurde der ÜS abgenommen und auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurde das Sediment erneut bei 100°C für 3-5 min aufgekocht und nach Zugabe von 50-100 µl „Cracking“-Puffer für 1 min intensiv gevortext. Der nach 5

min bei 13000 Upm Sedimentieren erhaltene zweite ÜS konnte mit dem ersten ÜS vereinigt werden. Der vereinigte ÜS wurde nochmals 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend über SDS-PAGE analysiert.

„Cracking“-Puffer Stocklösung:	8 M	Harnstoff
	5 %	SDS
	40 mM	Tris-HCl pH 6,8
	0,1 mM	EDTA pH 8,0
	0,4 mg/ml	Bromphenolblau
Proteaseinhibitor-Lösung:	0,1 mg/ml	Pepstatin A
	0,03 mM	Leupeptin
	145 mM	Benzamidin
100x PMSF:	0,174 g	(PMSF)
	in 10 ml	Isopropanol
„Cracking“-Puffer komplett: (frisch ansetzen)	1ml	„Cracking“-Puffer Stocklösung
	10 µl	β-Mercaptoethanol
	70 µl	Proteaseinhibitor-Lösung
	50 µl	100x PMSF

Tabelle 35: Lösungen zur Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen.

8.17.11 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen (A)

Mit Hilfe der hier beschriebenen Methode konnte aus den Hefezellen eines Klonen ein DNA-Gemisch aus genomischer-DNA und dem Plasmid-DNA extrahiert werden. Dazu wurde 5 ml Medium mit der höchsten Stringenz mit einer Kolonie des Klonen angeimpft und für 18-20 h bei 30°C und 250 UpM inkubiert. Diese Flüssigkultur wurde bei 700 xg für 5 min sedimentiert, das Sediment in 1 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 3 min bei 13000 UpM sedimentiert. Der ÜS wurde verworfen und das Sediment in 500 µl Lysis-Puffer durch Pipettieren gut resuspendiert. Diese Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß mit 300 mg Glaskügelchen überführt und zum Aufbrechen der Zellmembranen für 2-5

min gevortext. Der ÜS wurde in ein Eppendorfgefäß mit 275 µl 7 M Ammoniumacetat überführt und für 5 min bei 65°C aufgeköcht. Es folgte 5 min Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 500 µl Chloroform wurde der Ansatz kurz gevortext und für 2 min bei 13000 UpM sedimentiert wobei sich zwei Phasen ausbildeten. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in 900 µl Isopropanol pa. überführt, anschließend für 5 min bei RT inkubiert und für 5 min bei 13000 UpM sedimentiert. Der ÜS wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach 5 min Sedimentieren bei 13000 UpM wurde der ÜS verworfen und das DNA-Sediment getrocknet. Dieses Sediment wurde je nach Größe in 30-50 µl TE oder sterilem ddH₂O aufgenommen. Die gewünschte Plasmid-DNA wurde durch Transformation in *E.coli* (TG1) bzw. in hochtransformationskompetente DH5α (Invitrogen,) selektiv angereichert. Durch Kultivieren auf Agarose-Nährplatten mit der Ampizillin Resistenz überlebten schließlich nur die Bakterien, mit den das Köder-Protein enthaltenden pGADT7-Rec Plasmiden.

Lyse-Puffer: (frisch ansetzen)	1 %	SDS
	100 mM	Tris-HCl; pH 8,0
	50 mM	EDTA
Ammoniumacetat-Lösung:	7 M	Ammoniumacetat; pH 7

Tabelle 36: Lösungen A zur DNA-Extraktion aus Hefezellen.

8.17.12 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen (B)

Diese Methode zur Extraktion von DNA aus Hefezellen führte nicht bei allen Hefeklonen zur erfolgreich Plasmidextraktion und daher wurde zumeist nach der oben beschriebenen Methode verfahren. Auch hier wird zur DNA-Extraktion zunächst eine Flüssigkultur angesetzt und das daraus wie oben beschrieben ein Zellpellet gewonnen. Diese wurde Hefe-Lysispuffer resuspendiert und die Suspension in ein Eppendorfgefäß mit 300 mg Glaskügelchen überführt. Dazu wurden 300 µl eines Phenol-Chloroform-Gemischs (Verhältnis von Chloroform zu Phenol wie 1:1) zugegeben. Das Phenol-Chloroform-Gemisches war zuvor 10 min bei 1000xg zentrifugiert worden, worauf der wässrige Überstand abgenommen werden konnte. Anschließend wurde die Suspension für 2-5 min gevortext und für 5 min bei RT mit 13000 UpM sedimentiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit

1/10 des Volumens mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) sowie 2,5x des Volumens an absolutem Ethanol pa. präzipitiert. Dazu wurde das Eppendorfgefäß für 10 min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend für 10 min bei 13000 UpM bei 4°C sedimentiert. Der ÜS wurde verworfen und das DNA-Sediment getrocknet. Dieses Sediment wurde je nach Größe in 30-50 µl TE oder sterilem ddH₂O aufgenommen. Durch Transformation in *E.coli* (TG1) bzw. hochtransformationskompetente DH5α (Invitrogen,) konnte die gewünschte Plasmid-DNA selektiv angereichert werden.

Hefe-Lysispuffer:	2 %	Triton X-100
(frisch ansetzen)	1 %	SDS (Fluka)
	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl; pH 8,0
	1 mM	EDTA
Natriumacetat-Lösung:	3 M	Natriumacetat; pH 5,2
(steril autoklaviert)		
Phenol-Chloroform-Lösung:	1:1	Phenol : Chloroform
		10 min 1000 xg anschließend
		abgeschiedenes Wasser abnehmen

Tabelle 37: Lösungen B zur DNA-Extraktion aus Hefezellen.

8.17.13 *β*-Galactosidase Filter Test

Der *β*-Galactosidase Filter Test gilt als eine der sensitivsten Methoden die Expression des lacZ-Reprotergens in transformierten Hefeklonen nachzuweisen. Die Expression des LacZ-Reportergens wird durch eine Interaktion von Fänger und Köderprotein vermittelt und ermöglicht hydrolytische Spaltung von X-Gal. Positive Klone konnten anhand des dabei anfallenden blauen Präzipitat nachgewiesen werden. Die zu testenden Klone aus dem Y2H-Ansatz wurden zuvor für 1-2 Tage auf –AHLT-Nährmedienplatten kultiviert. Diese Kolonien wurden mittels eines sogenannter Filterabklatsches auf ein steriles Whatman-Filterpapier transferiert. Dazu wurde das Filterpapier auf die Nährmedienplatte mit den Klonen aufgelegt, leicht angedrückt bis das Filterpapier durchfeuchtet war und wieder abgehoben. Dieser Abklatsch wurde luftblasenfrei auf eine –AHLT-Nährmedienplatte aufgelegt und so über Nacht bei 30°C kultiviert. Um eine repräsentative Blaufärbung zu erhalten wurden mehrere

Einzelkolonien desselben Transformationsansatzes auf ihre β -Galactosidase Aktivität getestet. Zudem wurden entsprechende Negativkontrollen bzw. Positivkontrollen auf derselben Platte mitgeführt. Durch Tiefgefrieren für 30-60 s in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei RT wurden die Zellmembranen der Hefezellen aufgebrochen und die β -Galactosidase freigesetzt. Ein weiteres steriles Whatman-Filterpapier #5 war in einer Petrischale mit 1 ml Z-Puffer/X-Gal durchtränkt worden. Darauf wurde der Abklatsch mit noch oben gewandten Klonen luftblasenfrei aufgelegt, leicht angedrückt und mit weitem 1-2 ml Z-Puffer/X-Gal bis zur Sättigung durchtränkt. Die Petrischale wurde mit Parafilm verschlossen und für 4-8 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde regelmäßig das Auftreten blauer Kolonien überprüft.

Z-Puffer-Stocklösung:	16,1 g/L	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
(autoklavieren)	5,50 g/L	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	0,75 g/L	KCl
	0,246 g/L	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	ad 1L	dd H_2O
<hr/>		
X-Gal:		5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Roche,)
<hr/>		
Z-Puffer/X-Gal-Lösung:	100 ml	Z-Puffer
	0,27 ml	β -Mercaptoethanol (Sigma,)
	1,67 ml	X-Gal-Lösung

Tabelle 38: Lösungen für den X-Gal-Test.

9 Ergebnisse

9.1 RNA-Ergebnisse: Gewinnung der gesamt RNA und Herstellung einer cDNA Bibliothek

9.1.1 Extraktion der Gesamt RNA aus HL60/S4 Zellen

Die gesamt RNA wurde aus ca. 4×10^8 HL60/S4-Zellen zwei Tage nach der Induktion mit 1 mM Retinsäure gewonnen. Dies geschah mit Hilfe der „acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction“ (Chomczynski P., Sacchi N. (1987).

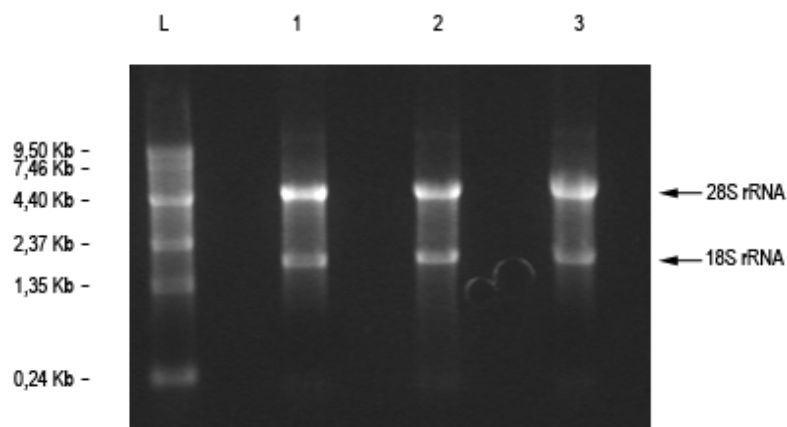


Abb.: 10 Gesamt-RNA aus HL60/S4 Zellen zwei Tage nach Induktion mit 1 mM Retinsäure auf denaturierendem 1,1 % Formaldehyd Gel. L 0,24-9,5 Kb RNA Leiter 1 0,5 μ g gesamt RNA 2 1 μ g gesamt RNA 3 2 μ g gesamt RNA.

9.1.2 Aufreinigung der Poly (A)⁺ RNA aus der Gesamt-RNA

Aus der Gesamt-RNA wurde die Poly (A)⁺ RNA extrahiert. Dazu wurden 1 mg ~ 4105 μ l der Gesamt-RNA mit einer Konzentration von 0,2436 μ g/ μ l mit Hilfe von Linearem Polyacrylamid gefällt und über eine PolyA-Säule (Invitrogen) aufgereinigt. Zur Berechnung der Konzentration der Poly (A)⁺ RNA wurde nach der Eluation OD_{260/280} bestimmt und daraus eine Konzentration von 0,11 μ g/ μ l berechnet. Daraus ergab sich eine Gesamtmenge von 110 μ g Poly (A)⁺ RNA in 1 ml Eluat, was etwa 10 % der Gesamt-RNA entspricht. In **Abb.: 11** wurde auf einem 1,1% Formaldehydgel neben der RNA-Leiter 1 μ g der aufgereinigte Poly (A)⁺ RNA sowie 1 μ g der Gesamt-RNA aufgetragen. Es zeigte sich, daß in der aufgereinigte Poly (A)⁺ RNA zwar immer noch die Banden für 18S- und 28S-rRNA enthalten waren, jedoch deutlich in deutlich

geringerem Ausmaß. Somit konnte von einer deutlichen Anreicherung der Poly (A)+-RNA ausgegangen werden.

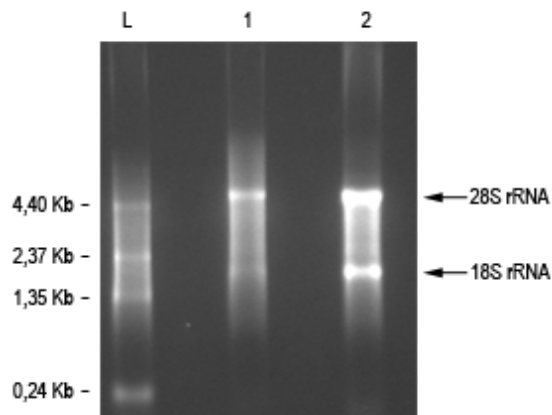
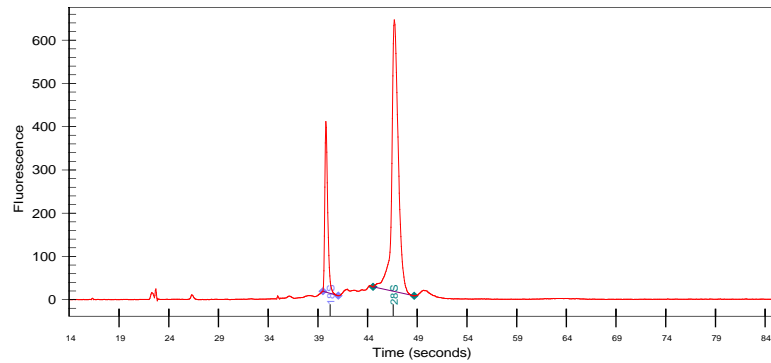


Abb.: 11 Gesamt-RNA aus HL60/S4 Zellen zwei Tage nach der Induktion mit 1 mM Retinsäure auf einem denaturierenden 1,1 % Formaldehyd Gel. (L) 0,24-9,5 Kb RNA Leiter (1) 0,5 µg Poly (A)+-RNA (2) 1 µg gesamt RNA.

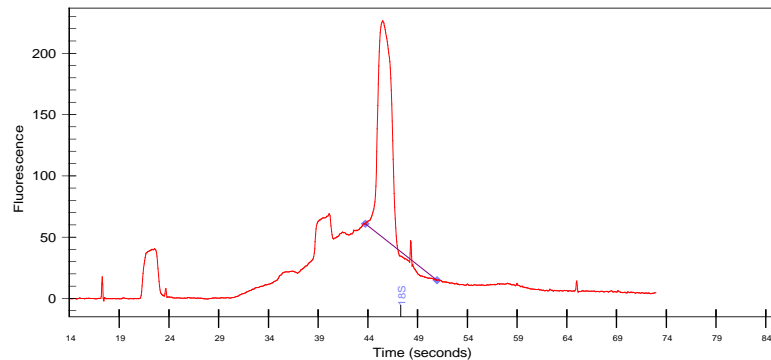
9.1.3 Qualitative Analyse der gesamt RNA und der Poly (A)+ RNA

Die Poly (A)+-RNA macht nur etwa 1-3 % der Gesamt-RNA aus. Mit Hilfe des „Agilent Bioanalyzers“ wurde eine qualitative Analyse der RNA durchgeführt um die Anreicherung der Poly (A)+-RNA gegenüber der 18S- und 28S-rRNA durch die Aufreinigung zu überprüfen. Des weiteren sollte RNase-Abbau innerhalb der RNA-Proben ausgeschlossen werden. Im Bioanalyzer wurden die Proben in einer Gelmatrix electrophoretisch aufgetrennt. Da die Probe durch einen „RNA 6000 Nano Dye“ Fluoreszenz markiert wurden, konnten die einzelnen Komponenten über ihre Fluoreszenz detektiert werden und durch die „Agilent 2100 expert Software“ in einem Elektropherogramm dargestellt werden. Die **Abb.: 11** zeigt in a) die Auftrennung von 1,5 µg Gesamt-RNA im Vergleich zu b) 1,5 µg Poly (A)+-RNA aus HL60/S4 Zellen zwei Tage nach der Induktion mit 1 mM Retinsäure. Die Beiden Spitzen im Elektropherogramm stellen die 18S- bzw. die 28S-rRNA dar. Im Vergleich zur Abbildung a) sind die beiden Spitzen in b) deutlich reduziert was auf die Anreicherung der Poly (A)+-RNA hinweist. In **Abb.: 11** c) wurde als Marker eine RNA-Leiter aus RNA-Transkriptionsfragmenten mit 0.24 Kb, 1.35 Kb, 2.37 Kb, 4.4 Kb und (Ambion) auf die selbe Weise aufgetrennt.

a) Gesamt RNA



b) Poly (A)+ RNA



c) RNA-Leiter

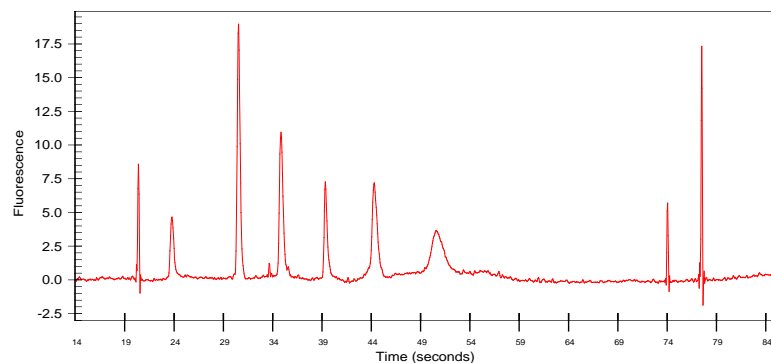


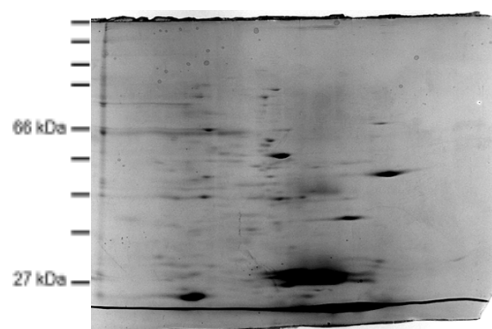
Abb.: 12 a) gesamt RNA aus HL60/S4 Zellen zwei Tage nach der Induktion mit 1mM Retinsäure. b) Poly (A)+ RNA durch Spin Säule aus der gesamt RNA aufgereinigt. c) RNA Leiter aus RNA Transkripten mit 0.2 Kb, 0.5 Kb, 1.0 Kb, 2.0 Kb, 4.0 Kb und 6.0 Kb (Ambion). Alle RNA-Proben wurde jeweils auf 0,6 µg/µl verdünnt. Die Proben wurden mit Hilfe eines „Agilent 2100 Bioanalyzers“ untersucht.

9.1.4 2D Gele mit Poly (A)+-RNA

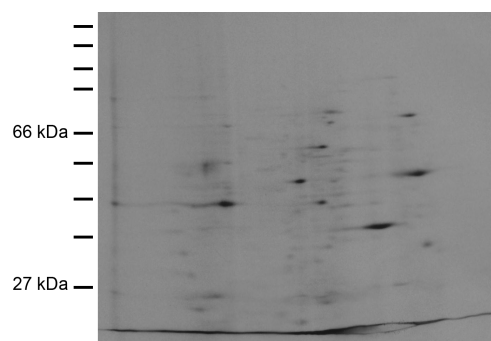
Um die Qualität der Poly (A)+-RNA zu überprüfen wurde die RNA unter Verwendung von 35S markiertem Cystein und Metionin translatiert und über 2D-Gelelektrophorese analysiert. Im Vergleich zur Positivkontrolle mit einer humanen Placenta-cDNA lässt sich die Qualität der HL60/S4 Poly (A)+-RNA im Bezug auf die Vielfalt der enthaltenen Proteine abschätzen. **Abb.: 13** zeigt: Nach einer viertägigen Exposition der getrockneten 2D-Gele waren im Bereich zwischen 66 kD und 27 kD

eine ähnliche Häufigkeit an Translataten zu beobachten wie bei der cDNA aus humaner Placenta. Die Exposition über 3 Wochen belegt diese Vielfalt noch deutlicher. Als Negativkontrolle wurde das gleichartig prozessierte Retikulozytenlysat ohne cDNA aufgetragen, so dass keine Translation erwartet wurde.

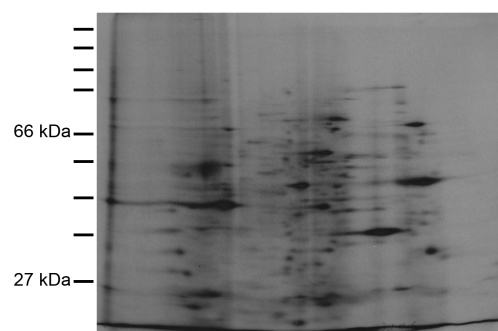
a) HL-60/S4 Poly (A)+ RNA Translatat



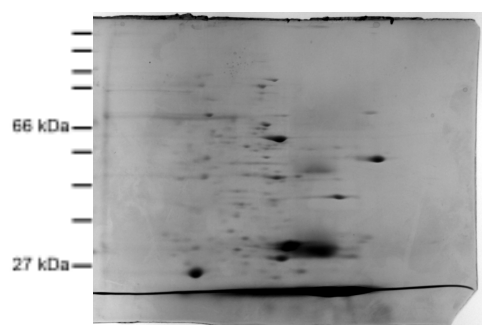
1b) 4 Tage Exposition



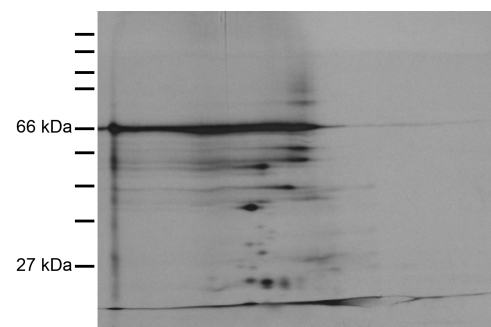
1c) 3 Wochen Exposition



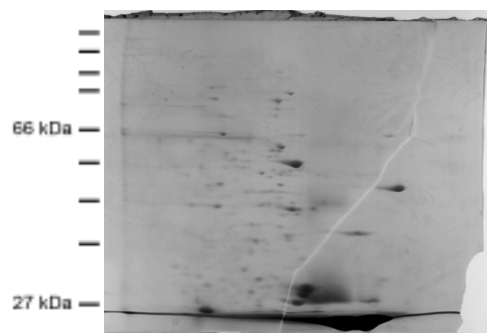
2a) Positiv Kontrolle hum Plazenta Translatat



2b) 4 Tage Exposition



3a) Negativ Kontrolle Translatat ohne RNA



3b) 4 Tage Exposition

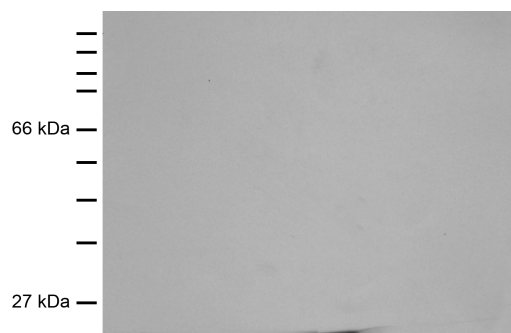


Abb.: 13 2D Gelelektrophorese der Translatate der HL60/S4 Poly (A)+ RNA im Vergleich mit einer hum Placenta. 1a, 2a und 3a Coomassie gefärbte Polyacrylamid Gele. 1b) Translatat der HL-60/S4 Poly (A)+ RNA nach 4 Tagen Exposition 1c) nach 3 Wochen Exposition. 2b) Translatat der hum Placenta cDNA nach 4 Tagen Exposition 3b) Negativ

Kontrolle nach 4 Tagen Exposition.

9.1.5 Umschreibung der Poly (A)+-RNA in doppelsträngige cDNA und Amplifikation mittels „long distance“-PCR

Die aufgereinigte Poly (A)+-RNA aus HL60/S4 Zellen zwei Tage nach Induktion mit 1 mM Retinsäure wurde mit Hilfe der „First Strand Synthese“ in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dazu wurden die „CDSIII/6 random“ Primer (Clontech) verwendet. Diese cDNA wurde mit Hilfe der Lang-Strecken-PCR (LD-PCR) vervielfältigt. Eine Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte über die „CHROMA SPIN“-Säulen (Clontech). Alle drei Schritte wurden mit Hilfe des „Library Construction and Screening Kit“ (Clontech) durchgeführt. **Abb.: 14** zeigt die so erhaltenen cDNA-Fragmente auf einem 2% Agarose-Gel. Zum Vergleich mit der HL60/S4-cDNA in Spur 2 wurde in der ersten Spur eine aus humaner Plazenta-cDNA erhaltene Poly (A)+ RNA aufgetragen. Bei beiden Proben liegt der Hauptanteil der erhaltenen Fragmente bei einer Größe zwischen 75 und etwa 1400 Nukleotiden. Ein von Clontech dargestelltes 1,2 % Agarose Et/Br Gel mit hum Plazenta-Poly (A)+-RNA zeigt den Hauptanteil der Fragmente bei einer Größe zwischen 0,75 und 1,5 kB. Die Umschreibung der Poly (A)+-RNA aus HL60/S4-Zellen hatte also zu einem ausreichend großen Spektrum der Fragmentgrößen geführt.

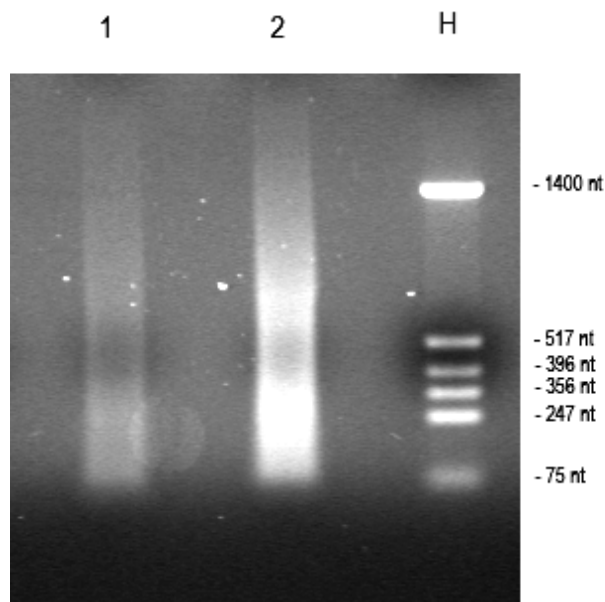


Abb.: 14: Umschreibung der Poly (A)+-RNA in doppelsträngige cDNA mit Hilfe von „CDSIII/6 random primern“ mit anschließender Amplifikation durch LD-PCR 1) Kontrolle: LD-PCR-Produkte aus der Poly A+-RNA aus hum Plazenta (Clontech). 2) LD-PCR-Produkte mit Poly (A)+-RNA aus HL60/S4-Zellen 2 Tage nach der Induktion mit 1 mM Retinsäure. H) Nukleotidmarker: Hinf.

9.1.6 Test der ds cDNA aus HL60/S4-Zellen durch PCR

Die wie oben beschrieben aus HL60/S4-Zellen hergestellte doppelsträngige cDNA wurde durch gezielte PCRs auf ihre Vielfalt überprüft. Dazu wurden Primerpaare für sechs verschiedene Gene aus dem Protein-Umfeld des Lamin B-Rezeptors verwendet. In der **Abb.: 15** sind in den Spalten 1 - 6 die PCR-Produkte für Vimentin (Vim), Lamin B-Rezeptor (LBR), Desmin (Des), Lamin B1 (LMNB1), Lamin A (LMNA) und Lamin B2 (LMNB2) dargestellt. In den Spalten 1p - 6p wurden jeweils nur die zugehörigen Primerpaare aufgetragen. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass das Signal der teilweise sehr kleinen PCR-Produkte möglicherweise durch die Primer selbst überdeckt wird. Die Banden der PCR-Produkte auf den 1,5 % Agarose-Gelen stimmte jeweils mit den erwarteten Fragmentgrößen (Abb.: 15 Zeile 3) überein. Für alle sechs ausgewählten Gene konnten mittels der entsprechenden Oligonucleotid-Primer durch PCR die zugehörigen Produkte erhalten werden. Aus den hergestellten Fragmentgrößen darf jedoch nicht auf die möglichen Fragmentgrößen innerhalb der cDNA-Bibliothek rückgeschlossen werden. Die cDNA-Bibliothek repräsentiert demnach einige wichtige Kernhüllenproteine.

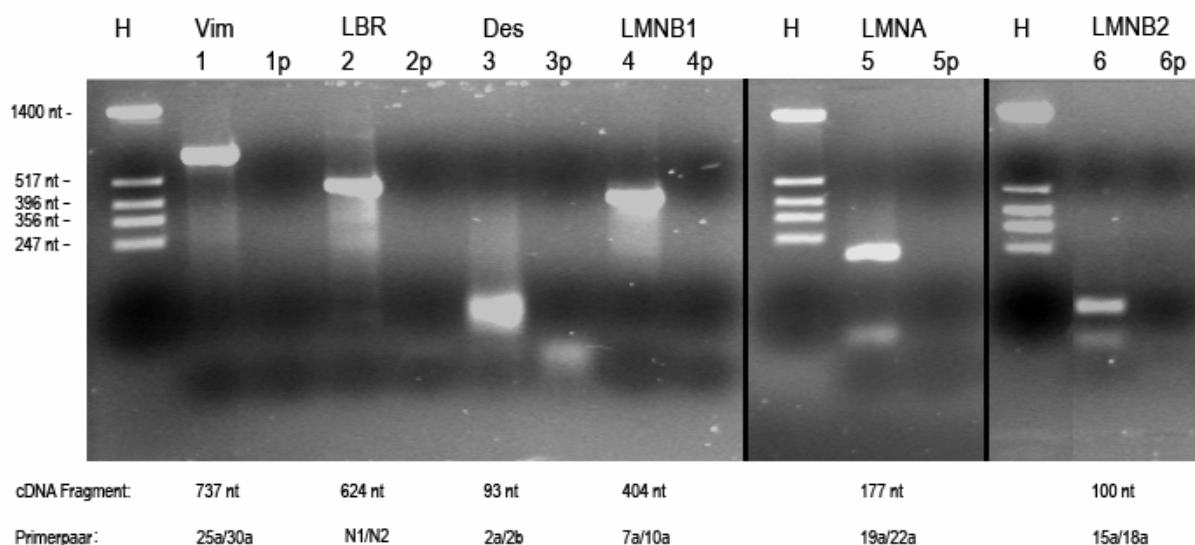


Abb.: 15 PCR-Test der aus Poly (A)+-RNA umgeschriebenen ds cDNA durch Primer verschiedener Gene. H) Nucleotidmarker: Hinf 1-6 PCR mit Primern für: hum Vimentin (Vim), hum Lamin B-Rezeptor (LBR), hum Desmin (Des), hum Lamin B2 (LMNB2), hum Lamin A (LMNA), hum Lamin B2 (LMNB2) 1p-6p die selben PCR-Primer wie in 1-6 jeweils ohne cDNA .

9.2 RT-PCR: Vergleichende Analyse der Genexpression ausgewählter Gene

HL-60/S4-Zellen lassen sich durch Zugabe von Retinsäure (RA) zu Granulozyten differenzieren. Mit Tetraphorbolester (TPA) hingegen schlagen sie den Weg der Differenzierung zu Makrophagen ein. In Proteinbiochemischen Untersuchungen von Ada und Don Olins et al. (1998) wurde belegt, dass während der Differenzierung zu Granulozyten der Proteingehalt von LBR in vergleichbaren Zellzahlen von HL-60/S4 stark anstieg, während zugleich deutliche Umstrukturierungen der Kernhülle beobachtet werden konnten. Mittels der RT-PCR-Methode sollte die Veränderung der Genexpression für LBR anhand der in den differenzierten Zellen verfügbaren Menge an LBR-mRNA untersucht werden. RNA, die mit Hilfe der Guanidiniumthiocyanat-Methode aus den Zellen gewonnen worden war, wurde mittels einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und durch eine PCR amplifiziert. Ziel dieser Untersuchung war es, nach Beginn der Differenzierung der HL-60/S4-Zellen einen Zeitpunkt zu definieren, zu dem die Menge an mRNA für LBR bereits deutlich angestiegen war, die Differenzierung jedoch noch wenig weit vorangeschritten war. Zu diesem Zeitpunkt, sollte auch die mRNA von solchen Proteinen stärker exprimiert werden, die zusammen mit LBR an der Umstrukturierung des Kerns beteiligt sind. Parallel zur Genexpression von LBR wurde die Expression von weiteren Kernhüllenproteinen wie Lamin A (LMNA), Lamin B1 (LMNB1) und Lamin B2 (LMNB2), sowie von Vimentin (Vim) und beta Aktin (ACTB), zwei Proteinen des cytoplasmatischen Cytoskeletts, untersucht. Die reverse Transkription wurde kontrolliert, indem das konstitutiv exprimierte Haushalts-Gen Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1) Ko-Transkribiert wurde. Mithilfe dieser in konstanter Menge an exprimierter mRNA wurden anschließend die Daten für alle anderen untersuchten Gene normiert. Zudem wurden die Ausgangswerte aller untersuchten Gene auf den Wert 1 normiert. Somit ist ein Vergleich der absolut exprimierten mRNA-Mengen nicht möglich. **Abb.: 16 a** zeigt, dass die Genexpression für LBR nach Induktion mit RA kontinuierlich stark zunimmt und sich nach fünf Tagen annähernd verdreifacht. Konträr dazu ist in **Abb.: 16 b** für die Induktion mit TPA eine deutliche Abnahme innerhalb von 5 Tagen bis mindestens um die Hälfte des Anfangsgehaltes zu beobachten. **Abb.: 16 a+b** zeigt, dass im Gegensatz zu LBR die Genexpression für LMNA nach Induktion mit RA trotz kurzfristig leichter Zunahme den Ausgangswert kaum überschreitet. Dahingegen tritt

nach Induktion mit TPA innerhalb von zwei Tagen eine deutliche Zunahme auf, die letztlich auf mehr als das Vierfache ansteigt, um bis zum fünften Tag nur um Weniges zu sinken. **Abb.: 16 c+d** zeigen, dass die Genexpression für LMNB1 nach Induktion mit RA vorübergehend nur auf das 1,5fache der Ausgangskonzentration ansteigt. Auch bei Zugabe von TPA ist nach einem Tage nur ein vorübergehender Anstieg auf etwa das Doppelte zu beobachten. Die Expression von LMNB2 nimmt sowohl für RA-Induktion als auch für TPA-Induktion innerhalb von fünf Tagen kontinuierlich ab (**Abb.: 16 c+d**). **Abb.: 16 e+f** lassen erkennen, dass die Genexpression für das Cytoskelett-Protein Vimentin nach Induktion mit RA innerhalb von fünf Tagen deutlich abnimmt, nach Zugabe von TPA jedoch schon nach zwei Tagen etwa um das Zwölffache ansteigt. Die Expression von ACTB nimmt sowohl nach Induktion mit RA als auch mit TPA innerhalb von fünf Tagen nur auf das Doppelte zu. Für die Extraktion der mRNA für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wird der Zeitpunkt zwei Tage nach Induktion mit RA festgelegt. Hier lässt sich ein ausreichender Anstieg von LBR vermerken.

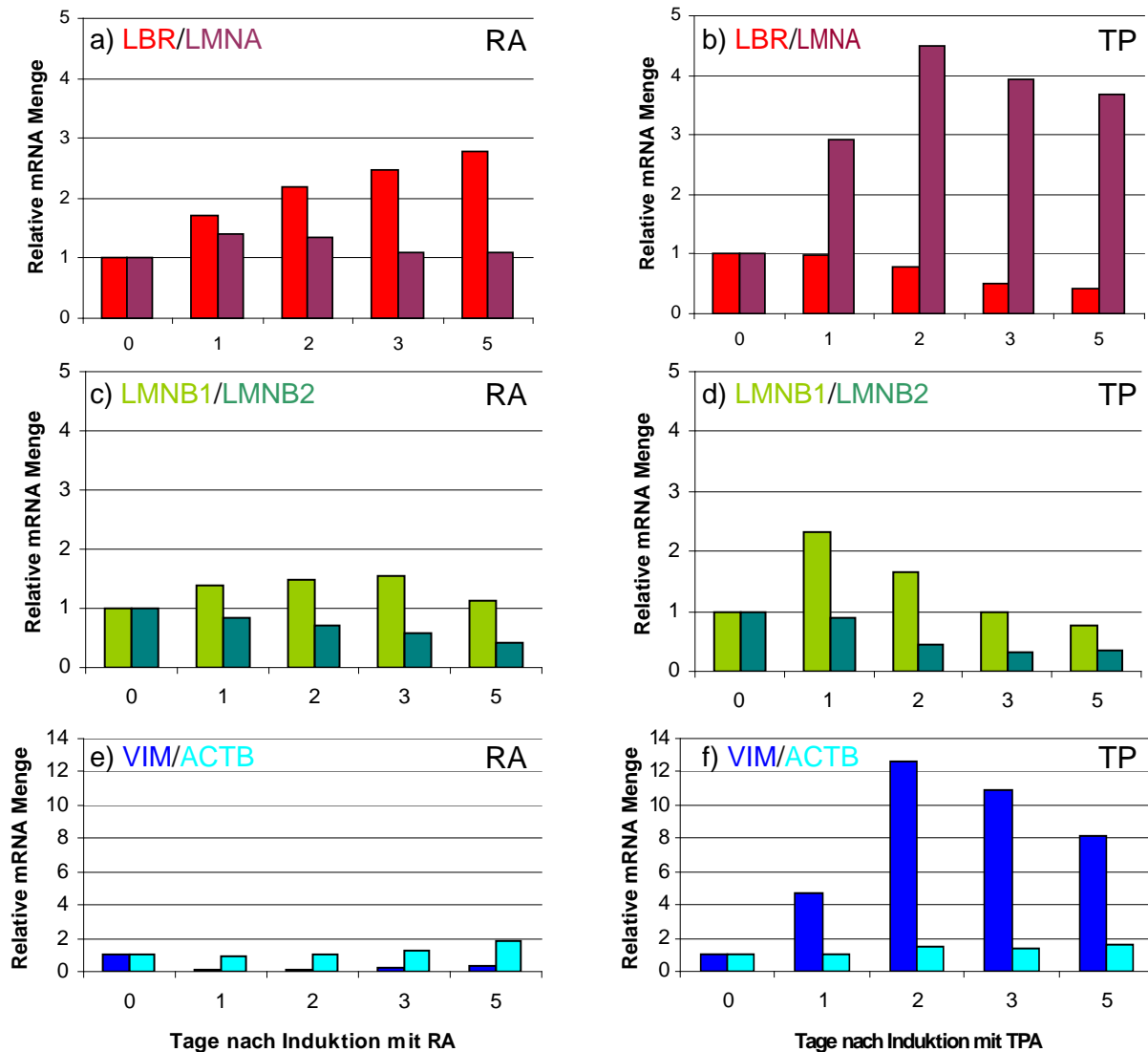


Abb.: 16: RT-PCR Untersuchung der Genexpression der Gene LBR, LMNA, LMNB1, LMNB2, VIM und ACTB in hum HL-60/S4 Zellen. a+c+e Untersuchung nach Induktion mit RA bzw. b+d+f TPA. Vergleichende Darstellung der relativen mRNA Menge nach Normierung mit dem konstitutiv exprimierten Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1) sowie Normalisierung aller Ausgangswerte auf 1. a+b Expressionsänderung der Gene LBR (rot) im Vergleich mit LMNA (erdrot). c+d Expressionsänderung der Gene LMNB1 (hellgrün) im Vergleich mit LMNB2 (dunkelgrün). e+f Expressionsänderung der Gene Vimentin (dunkelblau) im Vergleich mit LMNB2 (hellblau).

9.3 Analyse der Ergebnisse aus dem YTH-Ansatz

Mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid (YTH)*-Ansatzes wurden neue Interaktionspartner für LBR identifiziert. Dazu wurde das im Vergleich zu seinen Vorgängermodellen verbesserte "Matchmaker Two-Hybrid System 3" (Clontech, Heidelberg) verwendet.

Die Methode der Durchsuchung einer cDNA-Bibliothek nach Interaktionspartnern in einem YTH-Ansatz wurde ursprünglich von Fields and Song, 1998 beschrieben.

9.3.1 Herstellung der „bait“-Konstrukte

Für den YTH-Ansatz wurde als Fänger-Konstrukt die N-terminale Domäne AS 1-207 des Lamin B-Rezeptors verwendet (**Abb.: 17**). Dieses Fragment wurde in den Hefe Expressionsvektor pGBKT7-BD (BD Clontech, Heidelberg) inkloniert und in den Hefestamm AH 109 (Clontech, Heidelberg) transformiert. Der daraus entstandene Hefestamm AH 109 (LBR 1-210) wird innerhalb dieser Arbeit im Folgenden als „bait“-Stamm bezeichnet. Als Negativkontrolle wurde der Hefestamm AH 109, der mit dem „leeren“ pGBKT7-BD Vektor transformiert wurde, verwendet. Ein weiteres Fänger-Konstrukt umfasste den verkürzten N-Terminus von LBR von AS 61 – 210. Diesem Konstrukt fehlt also die erste globuläre Domäne von der angenommen wird, dass sie für die Interaktion mit Lamin B eine Rolle spielt (Holmer und Worman, 2001) (**Abb.: 17**). Dieses Konstrukt wurde nach dem Erhalt der potentiellen Interaktionspartner dazu verwendet um die Interaktionsdomäne derselben auf dem LBR-N-Terminus einzugrenzen. Der damit transfizierte Hefestamm wurde AH 109 LBR (AS 61-207) genannt.

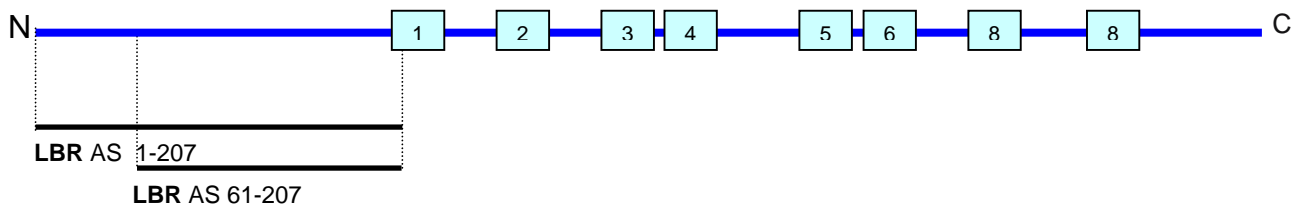


Abb.: 17 Schematische Darstellung der Proteinstruktur von LBR mit acht potentiellen Transmembrandomänen innerhalb der C-terminalen Domäne des LBR. Hervorgehoben sind die beiden „bait“-Konstrukte AS 1-207 und AS 61-207, die innerhalb der des YTH-Ansatzes verwendet wurden.

Alle Konstrukte wurden in Hefe als Fusionsproteine exprimiert, die zusätzlich zum LBR-Fragment auch eine GAL4-DANN-Bindedomäne und einen c-terminalen myc-tag enthielten. Der leere Kontroll-Vektor pGBKT7-BD hingegen enthielt nur die GAL4-DNA-Bindedomäne und den c-myc-tag. Um die Intensität der Expression des Proteins im Hefestamm AH 109 zu testen, wurden die Proteine aus den transformierten Hefestämmen isoliert und mit Hilfe der Western-Blot-Technik mit einem Antikörper gegen den c-myc-tag (9E10-2) analysiert. Um einen Hefeklon mit

einer hohen Proteinexpression zu identifizieren, wurden Zellextrakte von vergleichbaren Mengen auf einem 15% Kornberg-Gel elektrophoretisch analysiert. Das Molekulargewicht der exprimierten Proteine wurde mit Hilfe des Sequenzanalysprogramms „HUSAR“ (DKFZ, Heidelberg) bestimmt. Die erwarteten Massen für die GAL4-BD-myc-LBR (AS 1-207) betrug ca. 40 kDa (**Abb. 18** Spalte 2+3), für die GAL4-BD-myc-LBR (AS 61-207) ca. 35 kDa (**Abb. 18** Spalte 4+5). Wie erwartet konnte kein c-myc Fusionsprotein im Extrakt aus dem untransformierten Stamm AH 109 nachgewiesen werden (**Abb. 18** Spalte 1). Um den YTH-Ansatz durchzuführen wurde jeweils der Hefe-Klon mit dem höchsten Expressionsniveau gewählt (**Abb. 18** Spalte 3+4).

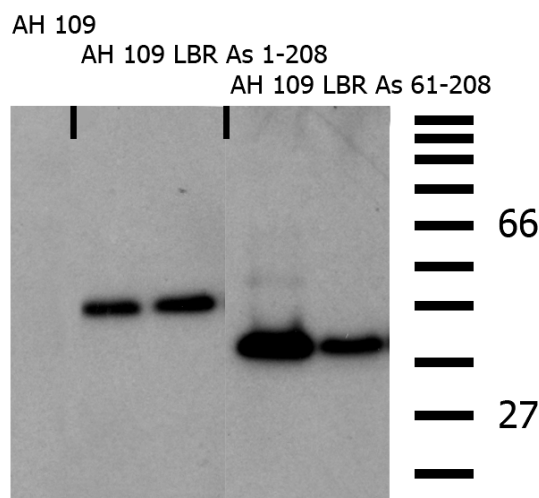


Abb. 18: Western Blot Analyse der Proteinexpression der transformierten Hefestämme AH 109 mit Hilfe des α -myc Antikörpers (9E10-2). Untransformierter AH 109 (Spalte 1). AH 109 transformiert mit dem „bait“-Konstrukt im pGBKT7-BD LBR (AS 1-207) Vektor (Spalte 2+3). AH 109 transformiert mit dem „bait“-Konstrukt im pGBKT7-BD LBR (AS 1-207) Vektor (Spalte 4+5). Proteingrößenmarker Angaben in kDa.

9.3.2 Ausschluss der Toxizität der „bait“-Konstrukte für den Hefestamm AH 109

Ob ein Fänger-Fusionsprotein toxisch für einen damit transformierten Hefestamm ist, lässt sich mittels der Wachstumsrate in Flüssigkulturen abschätzen. Die Wachstumsraten folgender Hefestämme in Flüssig Kultur wurden verglichen: AH 109 Zellen, die mit dem „leeren“ nicht toxischen pGBKT7-BD Plasmid transformiert wurden und AH 109 Zellen, die mit den beiden Fänger-Plasmiden pGBKT7-BD LBR (AS 1-207) oder pGBKT7-BD LBR (AS 61-207) transformiert wurden. Die Wachstumsrate wurde verfolgt, indem die OD_{600nm} in Zeitintervallen von je 30 min innerhalb von 5,5 h bestimmt wurde. Wie in der **Abb.: 19** dargestellt unterscheidet sich die Wachstumsrate des mit dem Fänger-Konstrukt pGBKT7 LBR (AS 1-207)

transformierten Hefestamms AH 109 kaum von der mit dem „leeren“ Vektor pGBKT7-BD-Plasmid transformierten Hefestamm. Auch das zweite Fänger-Konstrukt pGBKT7 LBR (AS 61-207) wirkte sich nur unwesentlich auf die Wachstumsrate der Hefezellen aus. Daher konnte die Toxizität der Fänger-Proteinfragmente für den Hefestamm AH 109 ausgeschlossen werden.

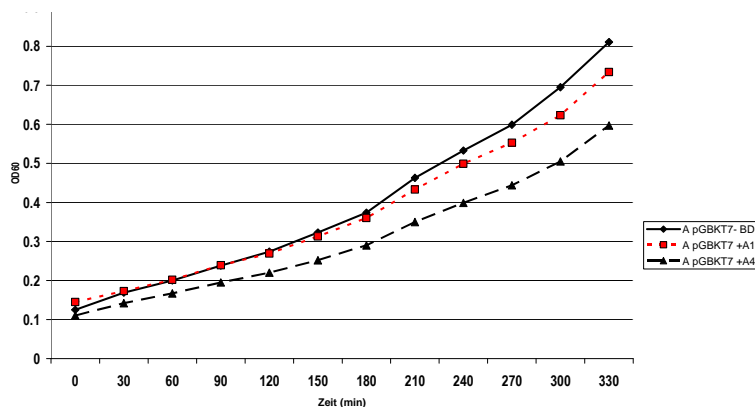


Abb.: 19: Vergleich der Wachstumskurven der transformierten Hefestämme (Raute schwarz) AH 109 pGBKT7 LBR (As 1-207), (Quadrat rot) AH 109 pGBKT7 LBR (as 61-207) und (Dreieck schwarz) AH 109 (pGBKT7-BD).

9.3.3 Ausschluss einer Autoaktivierung der Transkription durch die „bait“-Konstrukte

Um eine Aktivierung der Transkription der Reportergene durch die Fänger-Konstrukte selbst auszuschließen wurden die Fänger-Stämme AH 109-LBR (AS 1-207) und AH 109-LBR (AS 61-207) auf Nährmedienplatten ausplattiert, denen entweder die Aminosäuren Histidin und Tryptophan oder Adenin und Tryptophan fehlten. Dabei dienten Histidin und Adenin als Reportergene. Eine Aktivierung der Transkription dieser Reportergene sollte nur durch eine Interaktion der GAL4 Bindedomäne mit der GAL4-Aktivierungsdomäne aufgrund einer Interaktion der damit verbundenen Proteine hervorgerufen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass auf keiner der Nährmedienplatten ein Wachstum festgestellt werden konnte. Wie erwartet konnten die beiden transformierten Hefestämme jedoch auf den SD -Trp Nährböden wachsen. So war eine Aktivierung der Transkription der Reportergene durch die Fänger-Konstrukte ausgeschlossen. Der YTH-Ansatz wurde mit dem Fänger-Stamm AH 109 (AS 1-207) fortgesetzt.

9.3.4 Herstellung der „bait“-Konstrukte für den *YTH-High-Throughput-Ansatz*

Der Suche nach Interaktionen im *YTH-High-Throughput-Ansatz* wurde von der Gruppe von Prof. Wanker am “Max-Delbrück-Center” in Berlin etabliert. Wir nützten diesen Ansatz um in einer gewebespezifischen cDNA-Bibliothek in diesem Fall einer Bibliothek aus zerebralen Faktoren nach Interaktionspartnern für LBR zu suchen. Zu diesem Zweck erstellten wir weitere Fänger-Konstrukte, die letztlich die gesamte Nucleotidsequenz des hum LBR Proteins abdeckten (Abb.: 20). Desweiteren erstellten wir Konstrukte für Lamin A, Lamin B1 und Lamin B2. Insgesamt wurden 22 Fänger-Konstrukte für den *YTH-High-Throughput-Ansatz* zur Verfügung gestellt. In einem herkömmlichen Durchsuchungsansatz wird eine cDNA-Bibliothek mit einer weitgehend unbekannten Zusammensetzung verwendet. Der Vorteil der *YTH-High-Throughput-Ansatz* Technik liegt darin, dass die Suche nach Interaktionspartnern innerhalb einer sogenannten konstitutiven Bibliothek stattfindet. Diese setzte sich aus einer etwa 5000 genau charakterisierten zerebralen Faktoren zusammen. Der *YTH-Ansatz* ist so angelegt, dass innerhalb der Bibliothek nach jeder möglichen Interaktion zwischen allen teilnehmenden Interaktionspartnern gesucht wird. Dazu wird jedes Fänger-Konstrukt zugleich auch als „prey“-Konstrukt in die entsprechenden Hefeexpressionsvektoren kloniert. Durch Verpaaren jedes Fänger-Stammes mit jedem „prey“-Stamm kann theoretisch jedes der Fänger-Konstrukte auf seine Interaktionsfähigkeit mit jedem der „prey“-Konstrukte in den Hefen überprüft werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass in den Hefestämmen die Fänger-Konstrukte aufgrund einer stärkeren Promoterregion stärker exprimiert werden als die „prey“-Konstrukte. Alle von uns konstruierten Fänger- und „prey“-Konstrukte wurden zusammen mit den übrigen Kandidaten der Bibliothek durch die Wanker Gruppe bezüglich ihrer Toxizität für den verwendeten Hefestamm und bezüglich ihrer Fähigkeit der Autoaktivierung der Transkription der Reportergene überprüft. Für den *YTH-Ansatz* wurden jeder Fänger-Stamm mit jedem der Beute-Stämme verpaart. Diese diploiden Hefestämme wurden mehrere Male unter Beibehaltung hoch stringenter Wachstumsbedingungen passagiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle überlebenden diploiden Klone auf eine Interaktion der Fänger- und Beute-Konstrukte hinweisen, da sie die Fähigkeit besaßen, die Wachstumsreportergene zu aktivieren. Durch ein positives Signal innerhalb des X-Gal-Tests wurde diese Interaktion bestätigt. Dabei gab die Stärke der Blaufärbung

Auskunft über die Stärke der Interaktion. Die überwiegende Mehrheit der Kandidaten wurde von der Wanker Gruppe oder weiteren Teilnehmern bereitgestellt. Die Liste aller Teilnehmenden Fänger-Konstrukte wird durch die Wanker Gruppe publiziert werden, daher wird auf eine ausführliche Besprechung in dieser Arbeit verzichtet.

9.3.5 *Liste der „bait“-Konstrukte, die von uns für den YTH-High-Throughput-Ansatz bereit gestellt wurden*

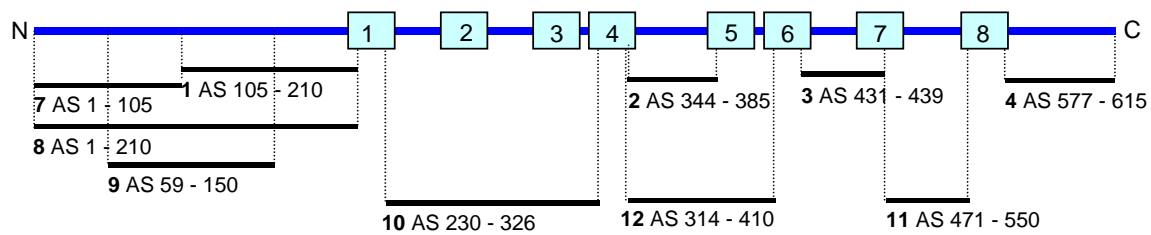
In der **Tabelle 39** sind alle Bait-Konstrukte aufgelistet, die für den *YTH-High-Throughput-Screen* von uns bereitgestellt wurden. Die cDNA-Konstrukte wurden sowohl in das Bait-Vektorsystem pGAD426 als auch in das *Prey*-Vektorsystem pBTM117c einkloniert. Wie in der **Abb.: 20** dargestellt, wurden für LBR mehrere überlappende Bait-Konstrukte hergestellt, die insgesamt das ganze LBR Protein abdeckten. Die stark hydrophoben Transmembrandomänen von LBR wurden weitgehend vermieden, da ihre Fähigkeit, in die Hefemembransysteme zu integrieren, eine Aktivierung der Reportergene verhindern würde. Daher waren zumeist nur die äußeren Aminosäuren der Transmembrandomänen im Konstrukt beinhaltet. Da Lamin B2 zwar als Interaktionspartner für LBR postuliert wird, was bisher nicht durch einen *YTH-Screen* gezeigt werden konnte, wurden auch einige Konstrukte generiert, die das gesamte Lamin B2 Protein abdeckten (**Abb.: 20; Tabelle 39**). Außerdem wurden Konstrukte hergestellt, die das gesamte Lamin A Protein abdeckten, und weitere Konstrukte, die das Lamin B2 Protein abdeckten. Konstrukte für Lamin A und Lamin B2 wurden durch Dr. Jens Schumacher aus unserem Labor hergestellt und sind mit der Abkürzung „Seq“ gekennzeichnet.

Konstrukte für LBR		
1 LBR	N-Terminus	AS 105 – 210
2 LBR	Zentrale Domäne	AS 344 – 385
3 LBR	Zentrale Domäne	AS 431 - 493
4 LBR	C-Terminus	AS (576)577 - 615
7 LBR	N-Terminus	AS 1 –105
8 LBR	N-Terminus	AS 1 –210
9 LBR	N-Terminus	AS 59 – 150

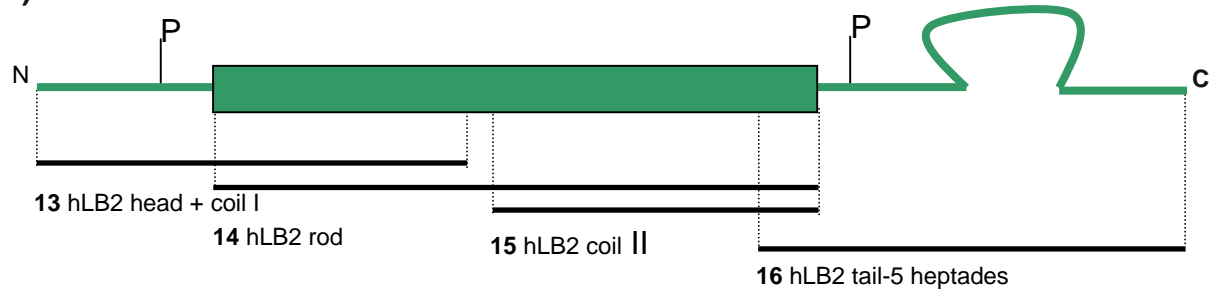
10 LBR	Zentrale Domäne	AS 230 - 326
11 LBR	Zentrale Domäne	AS 471 - 550
12 LBR	Zentrale Domäne	AS 314- 410
Konstrukte für LMNB2		
13 LMNB2	Head Coil I	AS 1- 230
14 LMNB2	Rod	AS 23- 383
15 LMNB2	Coil II	AS 236- 377
16 LMNB2	Tail+5Hep	AS 348- 600
Konstrukte für Lamin B1		
17- LMNB1	Coil 2B2	
18- LMNB1	Start-Mitte coil 2B2	
19- LMNB1	Potentielle Ig Fold Domäne	
20- LMNB1	C-Terminus	
Konstrukte für Lamin A		
21-LMNA	Coil 2B2	
22-LMNA	Start-Mitte coil 2B2	
23-LMNA	Potentielle Ig Fold Domäne	
24-LMNA	C-Terminus	

Tabelle 39: Sequenzen der Konstrukte für LBR, Lamin B2, Lamin B1 und Lamin A. Alle Konstrukte wurden in den Bait-Vektoren pGAD426 und den Prey-Vektor pBTM117c inkloniert. In Spalte 2 ist, Proteinsequenzbereich der cDNA Konstrukte dargestellt.

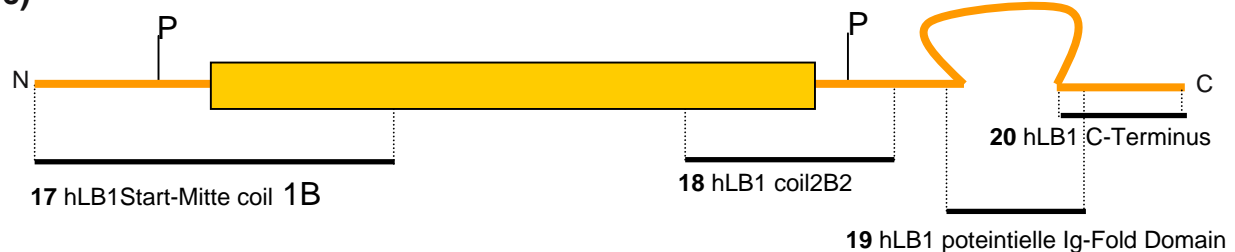
a)



b)



c)



d)

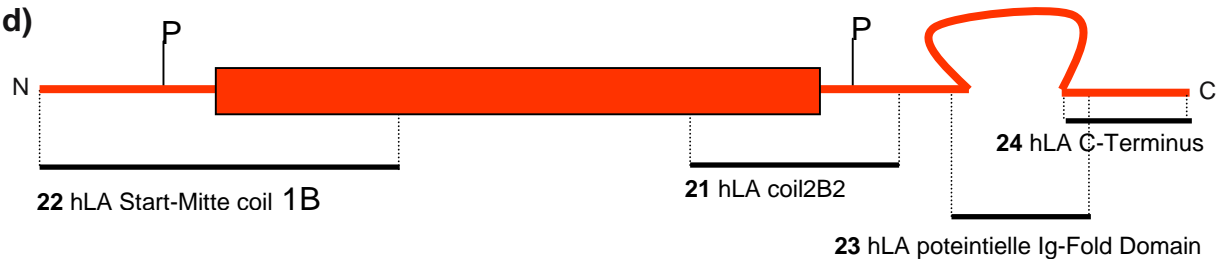


Abb.: 20: Schematische Darstellung der Fragmente, die für den YTH-High-Throughput-Screen eingesetzt wurden. a) Fragmente 1-4 und 7 – 12 des hum LBR mit den potentiellen Transmembrandomänen 1-8 b) Fragmente 13-16 des hum Lamin B1 c) Fragmente 17 – 20 des hum Lamin B2 d) Fragmente des 21-24 für hum Lamin A. Durch P sind Phosphorylierungsstellen dargestellt.

9.3.6 Transformation der cDNA in den „bait“-Hefestamm

Um nach potentiellen Interaktionspartnern für den N-terminalen Bereich von LBR zu suchen, wurde die cDNA Bibliothek aus HL60/S4-Zellen verwendet. Die mRNA zur Erstellung der Bibliothek wurde aus den Zellen zwei Tage nach der Differenzierung durch 1 μ M Retinsäure gewonnen. Daraus wurde die cDNA-Bibliothek mit Hilfe des

“*Matchmaker library construction and screening Kits*” (Clontech, Heidelberg) hergestellt. Der Zeitpunkt für die RNA-Extraktion war anhand der QRT-PCR-Daten bestimmt worden. Schon zwei Tage nach der Differenzierung war ein deutlicher Anstieg der mRNA für LBR festgestellt worden. Das „*Matchmaker library construction and screening kit*“ System arbeitet über Ko-Transformation der cDNA-Bibliothek und des linearisierten Beute-Vektors in den Fänger-Stamm AH 109 mit dem Fänger-Konstrukt pGBKT7-LBR (As 1-210). Die cDNA-Bibliothek wurde in diesen Fänger-Stamm zusammen mit dem linearisierten „*prey*“-Vektor transformiert, wobei die cDNA Bibliothek über homologe Rekombination in den „*prey*“-Vektor integrierte. Nach der Ko-Transformation wurden die Zellen unter hoch stringenten Wachstumsbedingungen gehalten, indem sie auf SD-A/-H/-L/-T Nährböden ausplattiert wurden.

9.3.7 **Kalkulation der Effizienz der Ko-Transformation der cDNA Bibliothek**

Fünf Tage nach dem Ausplattieren der transformierten Hefezellen wurden die Klone auf den SD -Leu / -Trp Platten und auf den SD – Leu-Kontroll Platten gezählt. Die Effizienz der Transformation wurde gemäß der folgenden Gleichung berechnet. Anzahl der Klone auf der SD -Leu Platte x 1000 = Anzahl der transformierten Zellen / 3 µg pGAdt/-Rec Vektor. Das Ergebnis sollte $> 1 \times 10^6 / 3 \mu\text{g pGADT7-Rec}$ sein. Die Anzahl der Kolonien auf der SD – Leu / - Trp Platte x 1000 = Anzahl der transformierten Hefe Zellen / 3 µg pGAdt7-Rec Vektor. Das Ergebnis sollte $> 5 \times 10^5$ sein.

9.3.8 **Isolation der Hefeklone von den primären YTH-Ansatz Platten**

Innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Ko-Transformation der cDNA-Bibliothek in den Fänger-Stamm AH 109 pGBKT7 (As 1-207) zeigten sich einzelne Kolonien auf den hoch stringenten Nährmedienplatten (SD –A/ -H / -L / -T). Alle Klone, die innerhalb von sechs Wochen nach der Ko-Transformation auf den Platten wuchsen, wurden geerntet. Im ersten Ansatz wurde so eine Gesamtzahl von 12 Klonen gefunden. In einem zweiten Ansatz wurden mit demselben Fänger-Konstrukt 26 Kolonien geerntet. Die Klone mit einem Durchmesser von etwa 2-3 mm wurden auf neue (SD –A/ -H / -L / -T) Nährmedienplatten übertragen fünf mal passagiert. Nur Klone, die aufgrund der Interaktion der Fänger- und „*prey*“-Konstrukte die

Wachstumsreportergene aktivieren konnten, waren in der Lage, unter diesem hohen Selektionsdruck zu wachsen.

9.3.9 *Isolation der „prey“-Plasmid DNA aus den Hefe Klonen*

Die Extraktion der Plasmide wurde nach der Ammoniumacetat/Chloroform Methode durchgeführt. Plasmid-DNA, die mithilfe der Phenol/Chloroform Methode extrahiert wurden, konnten oft nicht erfolgreich in die Bakterien transformiert werden. Die „prey“-Plasmid-DNA wurde amplifiziert, indem sie in den hoch kompetenten Bakterienstamm DH5 α (Invitrogen, Groningen Niederlande) transformiert wurde. Die DNA aus mehreren Bakterienklonen wurde extrahiert und durch einen Restriktionsverdau verglichen. Jeder Hefe-Klon sollte eine einzige „prey“-Plasmid-DNA enthalten. Doch selbst nach mehreren Passagen enthielten einige Klone mehr als eine „prey“-Plasmid-DNA. Somit wurden von einem Hefe-Klon für mehrere DNA-Extrakte eine Sequenzanalyse durchgeführt.

9.3.10 *Identifizierung der Klone des YTH-Ansatzes in NCBI-Banken*

In der folgenden Tabelle (**Tabelle 40**) sind für die Klone beider YTH-Ansätze die zugehörigen Accession Nummern aufgeführt. Um den Nukleotidsequenzen der Klone eine cDNA eines Proteins zuzuweisen, wurden die Nukleotidsequenzen mit den Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information) verglichen. Dies geschah mithilfe des Sequenzvergleich-Programms „Nucleotide Blast“, das von NCBI zur Verfügung gestellt wird. Im Fall, dass für einen Klon mehrere Accession Nummern mit identischer Sequenz zur Verfügung standen, wurde das zu diesem Zeitpunkt neueste Publikationsdatum gewählt. Für den Klon K 7.3, der Hipkinase 2 (HIPK2), wurden Accession Nummern mit Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Länge gefunden. In diesem Fall konnten wir von Prof. Dr. L. Schmitz den Klon mit voller Länge erhalten. Somit wird in der folgenden Liste nur diese Accession Nr. verwendet. Durch einen Vergleich der Leseraster der Klone innerhalb des „prey“-Plasmids mit dem originalen Leseraster konnten nicht übereinstimmende Klone identifiziert werden. Der Leserastervergleich wurde mit dem Sequenzvergleich-Programm „HUSAR clustal“ (DKFZ, Heidelberg) überprüft. Nicht übereinstimmende Klone wurden nicht weiter verfolgt. Angaben dazu befinden sich ebenfalls in dieser Tabelle (**Tabelle 40**). Die meisten Klone umfassten nur ein Fragment der cDNA des

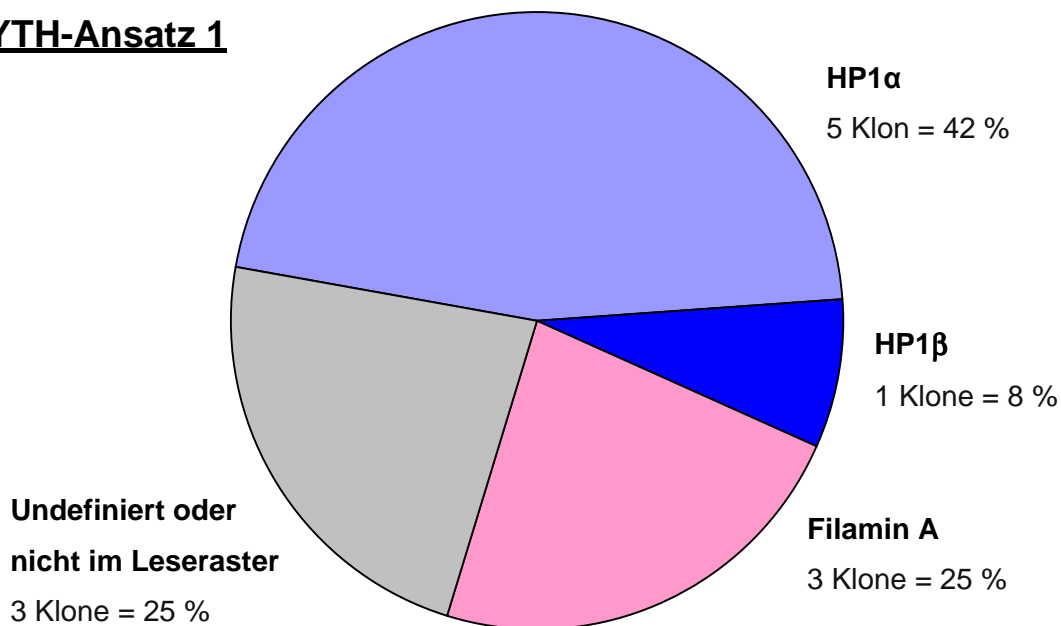
Proteins. Die Längen und die Position der Fragmente innerhalb ihrer cDNA mit gesamter Länge sind in **Abb.: 22** schematisch dargestellt.

Klon Nr.	Name des Proteins	Access Nr.	β-Gal. Test	Lese-raster
Klone aus YTH-Ansatz Ansatz 1				
K1,K5,K8,K12	Heterochromatin protein 1 α (HP1α)	NP_036249	+++	Ja
K2,K9,K13	Homo sapiens filamin A, alpha (FLNA) (actin binding protein 280 (ABP-280))	BC014654	+	Ja
K2.6.1	Homo sapiens heterochromatin protein 1 β (HP1β)	NP_006798	+	Ja
Klone aus YTH-Ansatz Ansatz 2				
K1 - K5 K9 - K12 K16.12 K19,K20,K25	Heterochromatin protein 1 α (HP1α)	NP_036249	+++	Ja
K6.3	Homo sapiens Est1p-like protein A mRNA	AY168921	+++	nein
K7.3 K13.1 K21.2	Homo sapiens homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2)	AF207291	+	Ja
K8	DNA konnte nicht extrahiert werden		+	
K14.1	Homo sapiens chromosome 17, clone RP5-843B9	AC004139	+++	Nein
K15.1	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast) (UBE21)	BC000427	+++	Ja
K17.3	Homo sapiens likely ortholog of kinesin	NM_022822	++	Nein

	light chain 2 (KLC2)			
K18.2	Homo sapiens poly(rC) binding protein 1 (PCBP1)	BC039742	+	Ja
K22.1	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4800042	BC042949	+	Nein
K23.1	Homo sapiens U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2 (U2AF)	BC008740	+	Ja
K24.1	Homo sapiens splicing factor 3a, subunit 2 (SF3A2) oder SAP62	BC009903	-	Ja
K26 – K 28	DNA konnte nicht extrahiert werden		-	-

Tabelle 40: Klone aus den beiden YTH- Ansätzen. Klonnummer, Name, Accession Nr., Qualität des β -Galaktosidase Tests (+ = schwache Blaufärbung; +++ = starke Blaufärbung), (- = keine Blaufärbung) , Klon war im Leseraster oder nicht.

YTH-Ansatz 1



YTH-Ansatz 2

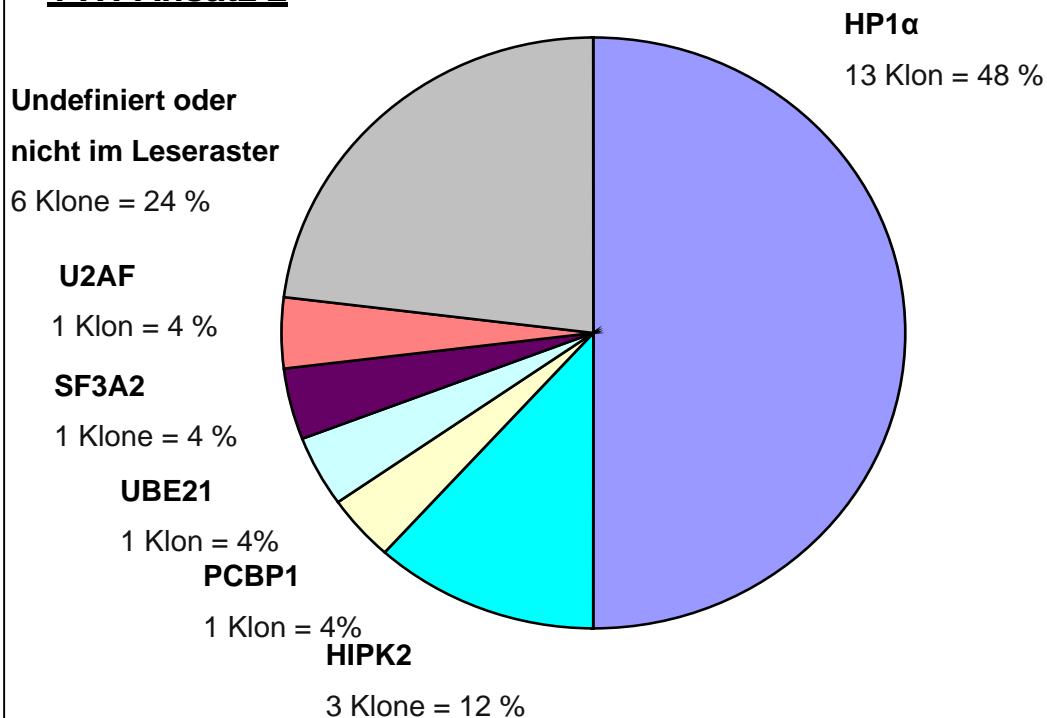


Abb.: 21: Darstellung der prozentualen Anteile der gefundenen Interaktionspartner für beide YTH-Ansätze mit dem „bait“-Konstrukt LBR (AS 1-207).

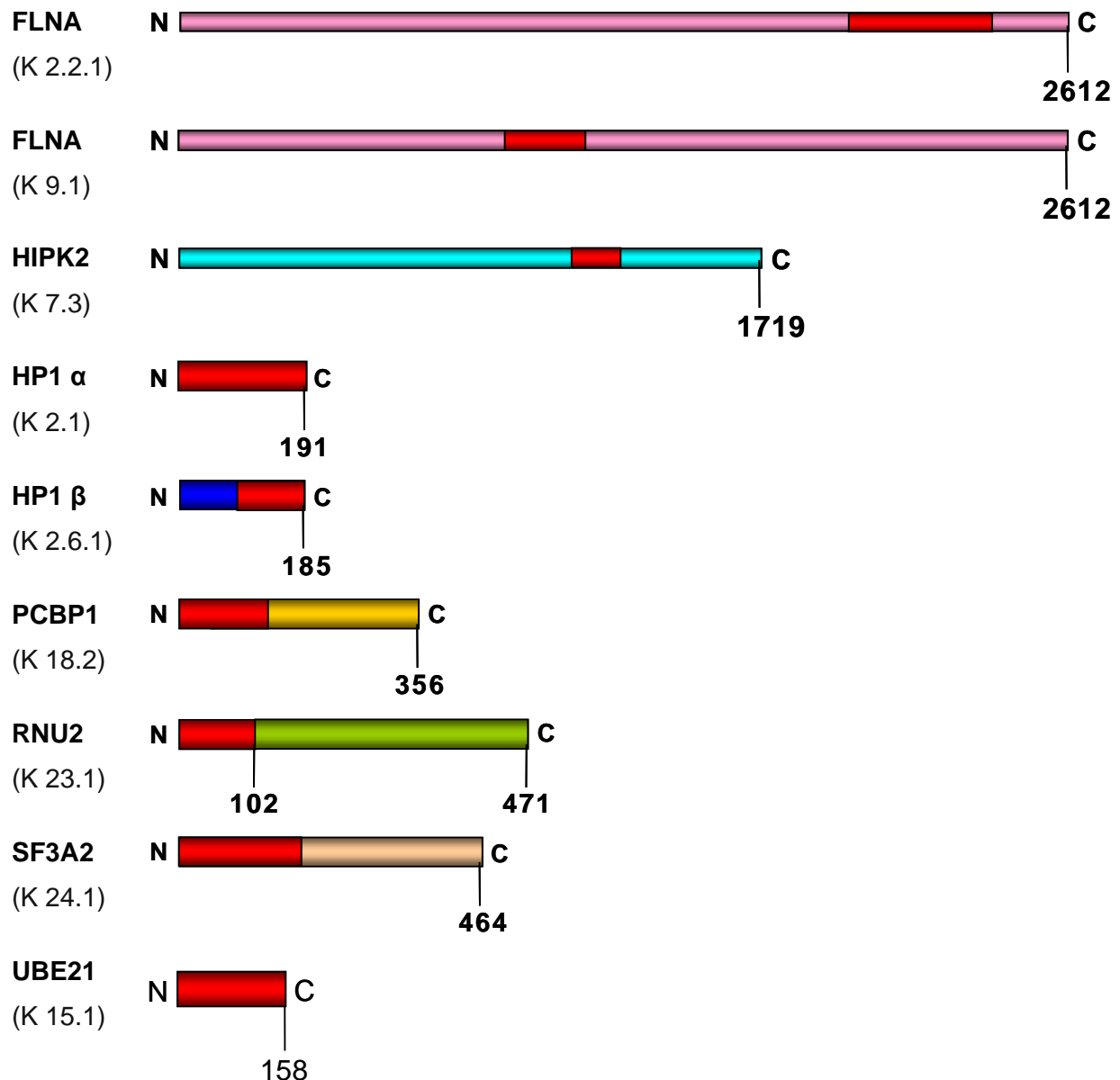


Abb.: 22: Schematische Darstellung der positiven Klone aus beiden YTH-Ansätzen. Rot sind jeweils die „prey“-Fragmente und ihre Position innerhalb des Proteins dargestellt.

9.3.11 Überprüfung der Interaktionen durch Rücktransformation der „prey“-Konstrukte in den „bait“-Stamm

Durch Rücktransformation der positiven „prey“-Konstrukte in den Fänger-Hefestamm AH109 + LBR (As 1-207) konnte die Interaktion zwischen dem „prey“- und dem Fänger-Fragment überprüft werden. Es zeigte sich, dass nach der Rücktransformation der „prey“-Konstrukte alle Hefeklone unter hohem Selektionsdruck überleben konnten. Dazu gehören die Klone: FLNA (K 9.1), FLNA (K 2.2.1), HIPK2 (K 7.3), HP1 α (K 2.1), HP1 β (K 2.6.1), PCBP1 (K 18.2), RNU2 (K23.1),

SF3A2 (K 24.1) und UBE21 (K 15.1) (**Abb.: 23**). Parallel dazu wurden die „prey“-Konstrukte auch in den Hefestamm Y187 LBR (AS 1-207) transformiert. Der Hefestamm Y187 unterscheidet sich von dem Hefestamm AH109. AH109 besitzt die Reporter Konstrukte ADE2, HIS3, lacZ und MEL1, die bei Aktivierung der GAL-4-Bindestelle durch eine Protein Interaktion exprimiert werden. Der Stamm Y187 enthält nur das lacZ- und das MEL1-Reporterkonstrukt. Dadurch kann er nur auf den weniger stringenten Nährböden –LTH und nicht wie der AH109 Stamm auf –AHLT Nährböden wachsen. Der Vorteil liegt in einer erleichterten Aktivierung des Lac-Z Reportergens. Das Erscheinungsbild des Y189 ist im Vergleich zu dem rötlichen AH109 Stamm eher weiß. Durch die erleichterten Wachstumsbedingungen sollten Klone mit einer schwachen Interaktion zwischen Fänger- und „prey“-Konstrukt verbesserte Überlebenschancen bekommen, um die Interaktion anschließend im X-Gal-Test überprüfen zu können. Es zeigte sich, dass nach der Rücktransformation der „prey“-Konstrukte in den Hefestamm Y187 alle Hefeklonen überleben konnten (Daten werden nicht gezeigt).

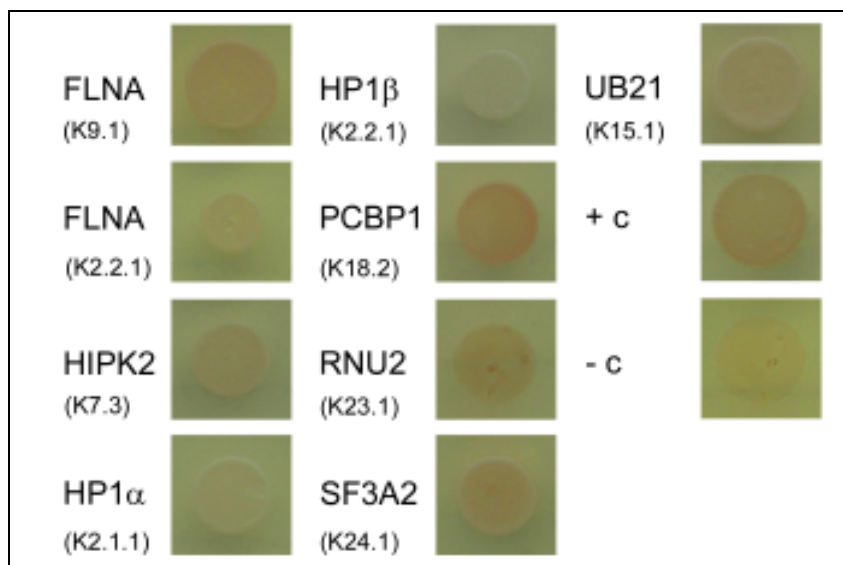


Abb.: 23: Rücktransformation der „prey“-Konstrukte aus den positiven Klonen in den „bait“-Hefestamm AH109 + LBR (AS 1-207): FLNA (K 9.1), FLNA (K 2.2.1), HIPK2 (K 7.3), HP1α (K 2.1), HP1β (K 2.6.1), PCBP1 (K 18.2), RNU2 (K23.1), SF3A2 (K 24.1), UBE21 (K 15.1). +c = Positivkontrolle, -c = Negativkontrolle.

9.3.12 X-Gal-Test

Zur weiteren Überprüfung der Interaktion der „prey“-Konstrukte mit dem Fänger-Konstrukt wurde der X-Gal-Test durchgeführt. Der Test führte im Fall einer

Interaktion zu einer Blaufärbung der Klone. Diese Blaufärbung basierte auf der Aktivierung des LacZ-Gens, was nur für den Fall einer starken Interaktion zwischen Fänger- und „prey“-Konstrukten zu erwarten war. Zu diesem Zweck wurden die „prey“-Konstrukte in den Hefestamm AH 109 + LBR (AS 1-207) kotransformiert und parallel dazu auch in den Hefestamm mit dem verkürzten LBR Konstrukt AH109 + (AS 61-207) transformiert (**Abb.: 24** Spalte 1+2). Eine positive Interaktion mit dem verkürzten Konstrukt sollte es ermöglichen, die Interaktionsdomäne mit dem LBR-N-Terminus weiter einzugrenzen. Anschließend wurde mit diesen Hefeklonen der X-Gal-Test durchgeführt. Zudem wurde der X-Gal-Test auch mit den kotransformierten Hefestämmen Y187 + LBR (AS 1-207) und Y187 + LBR (AS 61-207) durchgeführt (**Abb.: 25** Spalte 1+2). Für diesen Hefestamm wurde aufgrund des Wachstums auf weniger stringenten Nährmedienplatten eine bessere Aktivierung des LacZ-Gens erwartet, woraus sich eine stärkere Blaufärbung der Klone ergeben sollte. Nach mehreren Passagen unter entsprechendem Selektionsdruck wurden die Hefeklone durch die Abklatschtechnik auf ein Filterpapier übertragen und für eine Stunde mit dem X-Gal-Substrat inkubiert. Die Ergebnisse wurden mit den mitgeführten Negativ- und einer Positivkontrolle verglichen. Als Positivkontrolle diente ein diploider Hefestamm, der durch Verpaarung der Hefestämme Y187 („SV40-large-T-antigene“) und AH 109 pGBKT7–p53 erhalten worden war, deren „prey“- und „bait“-Fragmente als Interaktionspartner bekannt waren (**Abb.: 24** und **Abb.: 25**). Als Negativkontrolle diente der Hefestamm AH 109 + LBR (1-207) der mit dem Plasmid pGADT7-AD ohne „prey“-Konstrukt kotransformiert worden war. In den beiden Abbildung (**Abb.: 24** und **Abb.: 25**) sind nach Möglichkeit Triplets der kotransformierten Klone beider YTH-Ansätze dargestellt. Um eine Autoaktivierung der Reportergene durch die „prey“-Konstrukte auszuschließen, wurden diese in den Hefestamm mit dem Plasmidkonstrukt pGADT7-AD ohne „prey“-Konstrukt kotransformiert (**Abb.: 24** X Spalte 3 und **Abb.: 25** Spalte 3). Für den Fall einer Blaufärbung dieser Klone musste auf eine autoaktivierende Eigenschaft des „prey“-Konstrukts geschlossen werden. Eine positive Interaktion mit den beiden LBR Fänger-Konstrukten wäre in diesem Fall fälschlicherweise zustande gekommen.

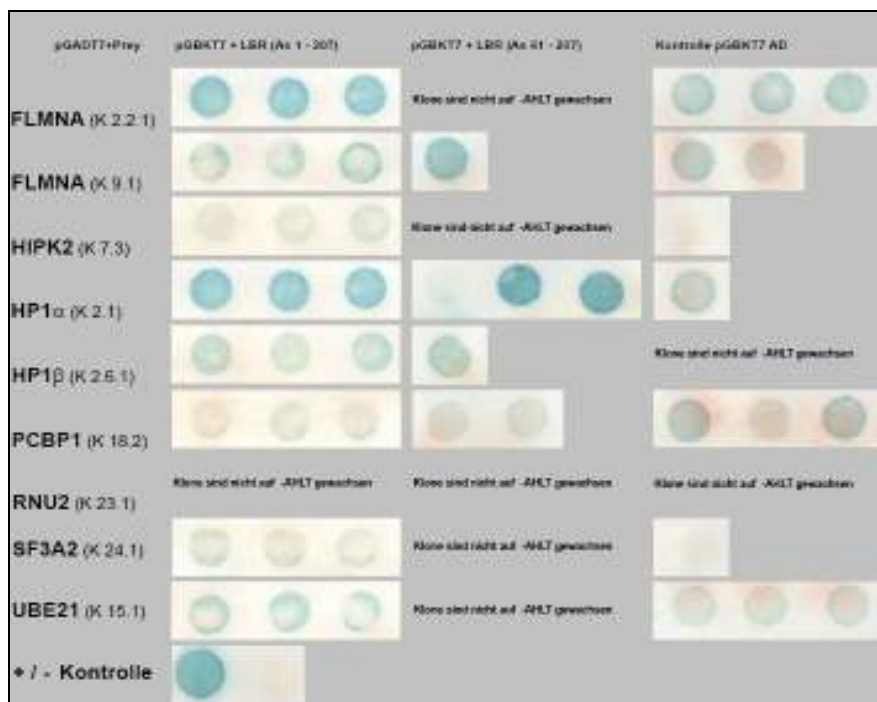


Abb.: 24: Hefestamm AH 109. X-Gal-Test nach Ko-Transformation der „bait“- und „prey“-Konstrukten in den Hefestamm AH109. Spalte 1: pGBKT7 + LBR (AS 1-207) wurde mit pGADT7 + Beute-Plasmide transformiert. Spalte 2: Ko-Transformation mit den pGBKT7 + LBR (AS 61-207) Plasmiden mit pGADT7 + Beute-Plasmide. Spalte 3: Ko-Transformation mit den pGBKT7-AD Plasmiden ohne „bait“-Konstrukt. Für jede Ko-Transformation wurden nach Möglichkeit drei mit denselben Plasmiden transformierte Hefe-Klone dargestellt.

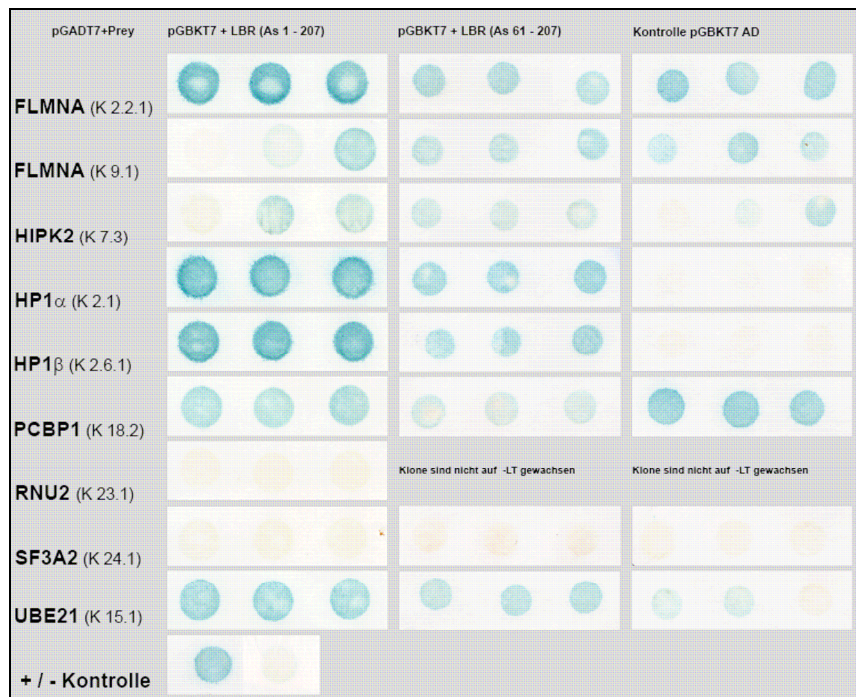


Abb.: 25: Hefestamm Y187. X-Gal-Test nach Ko-Transformation der „bait“- und „prey“-Konstrukte in den Hefestamm Y187. Spalte 1: pGBKT7 + LBR (AS 1-207) wurde mit den pGADT7 + „prey“-Plasmiden kotransformiert. Spalte 2: pGBKT7 + LBR (AS 61-207) wurde mit den pGADT7 + „prey“-Plasmiden kotransformiert. Spalte 3: Ko-Transformation mit den pGBKT7-AD Plasmiden ohne „bait“-Konstrukt. Jede Für jede Ko-Transformation wurden nach Möglichkeit drei mit denselben Plasmiden transformierte Hefe-Klone dargestellt.

9.3.13 Qualitative Beschreibung der Interaktionen basierend auf dem X-Gal-Test

Als Kriterium für eine starke Interaktion in Hefe wird im Folgenden die Blaufärbung der Ko-Transformationen im X-Gal-Test bewertet. Diese Interaktion sollte jedoch nicht überbewertet werden, da man hierbei genau genommen nur eine Interaktion der Peptide innerhalb der Umgebung des Hefesystems betrachtet. Umgekehrt kann eine Interaktion, die im Hefesystem als schwach bewertet werden muss, eine starke Interaktion in einem anderen System besitzen. So konnten einige der Wechselwirkungen mit Hilfe des GST-vermittelten Interaktionstests dennoch bestätigt werden.

Klon K 2.2.1 entspricht einem Abschnitt aus der cDNA des hum „filamin A, alpha“ (FLMNA)

In AH 109: Die Ko-Transformation des Klons K 9.1 mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte eine schwächere Blaufärbung. Nach der Ko-Transformation mit

dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 61-207) konnte ein Klon mit blauer Färbung erhalten werden. Die Ko-Transformation mit der Negativkontrolle pGADT7-AD zeigte eine schwache Blaufärbung, somit konnte eine Autoaktivierung nicht ausgeschlossen werden. In Y187: Die Ko-Transformation en mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte schwache bis starke Blaufärbungen. Die Ko-Transformation en mit LBR (AS 61-207) zeigten schwache Blaufärbungen. Gleiches galt auch für die Ko-Transformation en mit pGBKT7-AD. Dies ließ auf eine starke Autoaktivierung schließen. Aufgrund der Ergebnisse in der Hefe konnte somit nicht auf eine echte Interaktion geschlossen werden.

Klon K 7.3 entspricht einem Fragment aus der cDNA der hum „homeodomain interacting protein kinase 2“ (HIPK2)

In AH 109: Die Ko-Transformation des Klons K 7.3 mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte eine blasse, jedoch deutliche, Blaufärbung. Nach der Ko-Transformation mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 61-207) konnten keine Klone erhalten werden. Bei der Ko-Transformation mit der Negativkontrolle pGADT7-AD konnte nur ein Klon erhalten werden, der jedoch eine Blaufärbung zeigte. In Y187: Die Ko-Transformationen mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) führten zu zwei von drei Klonen mit einer intensiv Blaufärbung. Die Ko-Transformation mit LBR (AS 61-207) führten zu Klonen mit einer leichten Blaufärbung. Bei der Ko-Transformation mit pGBKT7-AD waren zwei von drei Klonen in der Lage, das LacZ-Reportergen zu aktivieren, wodurch eine Autoaktivierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine eindeutige Interaktion des Klons K 7.3 mit LBR (AS 1-207) und eine schwache Interaktion mit LBR (AS 61-207) in Hefe. Eine Autoaktivierung konnte nur für AH 109 ausgeschlossen werden.

Klon K 2.1 entspricht der volle Länge cDNA des hum „heterochromatin protein 1α“ (HP1α)

In AH 109: Die Ko-Transformation des Klons K 2.1 mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte eine intensive Blaufärbung. Eine ähnlich starke Blaufärbung konnte für zwei von drei mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 61-207) kotransformierte Klone beobachtet werden. Die Ko-Transformation mit der Negativkontrolle pGADT7-AD zeigte einen schwach blauen Hefe Klon, ein Zeichen für schwache Autoaktivierung. In Y187: Die Ko-Transformation en mit beiden Fänger-

Konstrukten führten zu einer intensiven Blaufärbung. Die Ko-Transformation mit pGBKT7-AD war nicht in der Lage, das LacZ-Reportergen zu aktivieren, wodurch eine Autoaktivierung ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine eindeutige Interaktion des Klons K.2.1 sowohl mit LBR (AS 1-207) als auch mit LBR (AS 61-207) in Hefe.

Klon K 2.6.1 entspricht der cDNA der “chromo shadow”-Domäne des hum „heterochromatin protein 1 β ” (HP1 β)

In AH 109: Die Ko-Transformation des Klons K 2.6.1 mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte eine intensive Blaufärbung. Eine ähnlich starke Blaufärbung konnte für einen von drei mit dem Biat-Konstrukt LBR (AS 61-207) kotransformierten Klon beobachtet werden. Bei der Ko-Transformation mit der Negativkontrolle pGADT7-AD konnte kein Klon erhalten werden. In Y187: Die Ko-Transformationen mit beiden Fänger-Konstrukten führten zu einer intensiven Blaufärbung. Die Ko-Transformation mit pGBKT7-AD war nicht in der Lage, das LacZ-Reportergen zu aktivieren, wodurch eine Autoaktivierung ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine eindeutige Interaktion des Klons K 2.6.1 sowohl mit LBR (AS 1-207) als auch mit LBR (AS 61-207) in Hefe.

Klon K 18.2 entspricht einem Abschnitt aus der cDNA für „poly(rC) binding protein 1” (PCBP1)

In AH 109: Die Ko-Transformation des Klons K 23.1 mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte keine Blaufärbung. Nach der Ko-Transformation mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 61-207) zeigten die Klone keine Blaufärbung. Die Ko-Transformation mit der Negativkontrolle pGADT7-AD zeigte ebenfalls keine Blaufärbung. In Y187: Die Ko-Transformationen mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte schwache bis starke Blaufärbungen. Die Ko-Transformationen mit LBR (AS 61-207) zeigten schwache Blaufärbungen. Gleiches galt auch für die Ko-Transformationen mit pGBKT7-AD. Dies ließ auf eine starke Autoaktivierung schließen. Aufgrund der Ergebnisse in der Hefe konnte somit nicht auf eine echte Interaktion geschlossen werden.

Klon K 23.1 entspricht einem Abschnitt aus der cDNA hum „U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2“ (U2AF)

In AH 109: Hefen des Stammes AH109 konnten nach der Ko-Transformation mit dem Klon K 23.1 dem hohen Selektionsdruck nicht standhalten. Es konnten keine Kolonien gebildet werden. In Y187: Nach der Ko-Transformation mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) konnten zwar Kolonien gebildet werden, diese zeigten jedoch keinerlei Blaufärbungen. Nach der Ko-Transformation mit LBR (AS 61-207) konnten keine Hefekolonien gebildet werden. Gleiches galt auch für die Ko-Transformation mit pGBKT7-AD. Diese Ergebnisse lassen nicht auf eine starke Interaktion in Hefe rückschließen.

Klon K 24.1 entspricht einem Abschnitt aus der cDNA des hum „U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2“ (SF3A2)

In AH 109: Die Ko-Transformation des Klons K 24.1 mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte eine sehr schwache Blaufärbung. Nach der Ko-Transformation mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 61-207) konnten keine Klone erhalten werden. Für die Ko-Transformation mit der Negativkontrolle pGADT7-AD konnte nur ein Klon erhalten werden, der keine Blaufärbung im X-Gal-Test zeigte, wodurch eine Autoaktivierung ausgeschlossen werden konnte. In Y187: Die Ko-Transformationen mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigten keine Blaufärbung. Die Ko-Transformation mit LBR (AS 61-207) zeigte ebenfalls keine Blaufärbung. Gleiches galt auch für die Ko-Transformationen mit pGBKT7-AD. Eine Autoaktivierung konnte somit ausgeschlossen werden. Trotz der schwachen Färbung im Test lassen diese Ergebnisse möglicherweise auf eine sehr schwache Interaktion des Klons K 24.1 mit LBR (AS 1-207) oder mit LBR (AS 61-207) in Hefe schließen.

Klon K 15.1 entspricht der cDNA des „ubiquitin-conjugating enzyme E2I“ (UBE2I)

In AH 109: Die Ko-Transformation des Klons K 15.1 mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) zeigte eine deutliche Blaufärbung. Nach der Ko-Transformation mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 61-207) konnten keine Klone erhalten werden, wodurch auch eine Autoaktivierung ausgeschlossen werden konnte. Für die Ko-Transformation mit der Negativkontrolle pGADT7-AD konnte jedoch eine leichte Blaufärbung im X-Gal-Test erhalten werden, was wiederum für eine leichte

Autoaktivierung sprechen würde. In Y187: Die Ko-Transformationen mit dem Fänger-Konstrukt LBR (AS 1-207) führten zu einer intensiven Blaufärbung. Die Ko-Transformation mit LBR (AS 61-207) führte zu Klonen mit einer leichteren Blaufärbung. Bei der Ko-Transformation mit pGBKT7-AD zeigten zwei von drei Klonen eine leichte Blaufärbung, wodurch eine Autoaktivierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine eindeutige Interaktion des Klons K 15.1 mit LBR (AS 1-207) sowie einer möglichen Interaktion mit LBR (AS 61-207) in Hefe. Eine Autoaktivierung konnte nur für AH 109 ausgeschlossen werden.

9.3.14 Überprüfung der Sequenzen aus dem YTH-high-throughput-Ansatz durch NCBI-Datenbank-Suche und HUSAR Analyse

In einem *YTH-high-throughput-Ansatz* wurden acht Fänger-Konstrukte verwendet, die das gesamte LBR-Protein abdeckten, außerdem fünf Fänger-Konstrukte, die das gesamte Lamin A abdeckten, vier Konstrukte für Lamin B1 und vier, die das gesamte Lamin B2-Protein abdeckten. Der *YTH-Ansatz* mit diesen Konstrukten lieferte insgesamt 36 positive Klone, die in der **Abb.: 26** aufgelistet sind. Diese Klone erhielten wir als Bakterien-Klone von der Arbeitsgruppe Wanker. Als zusätzliche Information erhielten wir mit jedem Klon auch die Sequenz der ersten ca. 700 bp der Nucleotidsequenz jedes Klons und die Namen der Proteine, die als „*prey*“-Konstrukte im *YTH-Ansatz* eingesetzt worden waren. Die Liste gibt zudem Auskunft über die Qualität der Interaktion der Fänger- und Beute-Konstrukte. Klone, die zur Gruppe SD4 gehören, sind in der Lage, die Wachstums-Reportergene *HIS3*, *URA3* zu aktivieren und können auf entsprechenden Medien wachsen. Die Klone der Gruppe LacZ4 sind in der Lage, alle Reportergene zu aktivieren (*HIS3*, *URA3* und *LacZ4*) und damit eine positive Reaktion im X-Gal-Test hervorzurufen. In unserem Labor wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterienklonen isoliert und deren Sequenz durch vollständige Sequenzierung der Klone überprüft. Auf diesen Sequenzen basieren die folgenden Analysen der Klone, die mit Hilfe des Sequenzvergleich-Programms „HUSAR“ (DKFZ, Heidelberg) ausgeführt wurden. Innerhalb einer NCBI Datenbank wurde die cDNA-Sequenzen für jeden Klon ermittelt. Die Übereinstimmung der Nucleotidsequenz der Klone mit den in NCBI gefundenen Nucleotidsequenzen der vollständigen cDNA-Sequenzen wurde mit Hilfe des Werkzeugs „clustal“ von HUSAR überprüft. Zudem wurden die enzymatischen Schnittstellen der Klone mit Hilfe des

Werkzeugs „map“ identifiziert. Um die Klonierung in andere Vektorsysteme wie den GFP-Vektoren vorzubereiten, wurden mit Hilfe von „HUSAR“ weitere Sequenz Analysen durchgeführt. So wurden die Leseraster der Klone mit dem ursprünglichen Leseraster der cDNA-Klone mit voller Länge aus den NCBI Datenbanken verglichen. Es zeigte sich, dass alle Klone mit dem originalen Leseraster übereinstimmten. Als Schnittstellen enthielten die meisten Klone die Restriktionsschnittstellen Sal I und Not I, einige der Klone die Restriktionsschnittstellen Eco RI und Not I oder Xho I und Not I. Jedoch waren zwei verschiedene Vektorsysteme mit unterschiedlichen Leserastern für die Klonierung verwendet worden.

Nr.	Name Accession Nr.	Beschreibung des Proteins	Klon- länge [bp]	SD4	LacZ4
Interaktion mit dem Fängerkonstrukt LBR-3					
31	FALZ NM_182641	Homo sapiens fetal Alzheimer antigen (FALZ)	?	++	-
Interaktion mit dem Fängerkonstrukt LBR-4					
31	FALZ NM_182641	Homo sapiens fetal Alzheimer antigen (FALZ)	?	+	-
Interaktion mit dem Fängerkonstrukt LMNB2-16					
20	APOA1 AY_422952	Homo sapiens similar to Apolipoprotein A-I precursor	785	+	-
Interaktion mit dem Fängerkonstrukt hLB1_IG (Seq169)					
24	PHYHIP BC_034034	Homo sapiens phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein	?	++	-
19	C16orf34 NM_144570	Homo sapiens chromosome 16 open reading frame 34	?	+	-
Interaktion mit dem Fängerkonstrukt hLA_Cterm (Seq162)					
1	TUSC4 NM_006545	Homo sapiens tumor suppressor candidate 4	1408	++	++
4	ZFP95 NM_405102	Homo sapiens zinc finger protein 95 homolog (mouse) (ZFP95)	2346	++	++
5	PRKCI NM_002740	Homo sapiens protein kinase C, iota	1265	++	++

6	GLB1 NM_000404	Homo sapiens galactosidase, beta 1 (GLB1)	?	++	++
7	ADAMTS10 NM_030957	Homo sapiens a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif	2257	++	++
12	ZNF235 NM_004234	Homo sapiens zinc finger protein 235 (ZNF235)	1244	++	++
13	RBBP4 NM_005610	Homo sapiens retinoblastoma binding protein 4 (RBBP4)	?	++	++
15	MCM3AP NM_003906	Homo sapiens MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) associated protein (MCM3AP)	?	++	++
18	PTN NM_002825	Homo sapiens pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	1230	++	++
22	ECH1 BC_011792	Homo sapiens enoyl Coenzyme A hydratase 1	684	++	++
26	MGC15730 BC_007618	Homo sapiens hypothetical protein MGC15730	846	++	++
28	HTF9C BC_017184	Homo sapiens Hpall tiny fragments locus 9C	?	++	++
33	CDH23	Homo sapiens cadherin-like 23	keine DNA	++	++
36	MASP1	Homo sapiens mannan-binding lectin serine protease 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)	keine DNA	++	++
37	NGFR	Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	keine DNA	++	++
10	COL4A5 BC_023556	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	757	++	+
32	SP110	Homo sapiens SP110 nuclear body protein	keine DNA	++	+
8	NIPA NM_016478	Homo sapiens nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (ALK) (NIPA)	1826	+	+
11	FBN3	Homo sapiens fibrillin 3 (FBN3)	?	+	+

	NM_032447				
14	TUBA3	Homo sapiens tubulin, alpha 1 (testis specific)	?	+	+
	NM_006009				
16	FLJ14888	Homo sapiens hypothetical protein FLJ14888	1542	+	+
	NM_032856				
21	SMT3H1	Homo sapiens SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (yeast) (SUMO3)	?	+	+
	BC_000036				
23	UNC119	Homo sapiens unc-119 homolog (C. elegans)	1592	+	+
	NM_054035				
25	ZNF145	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 16	?	+	+
	BC_029812				
27	PLXNB2	Homo sapiens plexin B2	1557	+	+
	BT_006887				
29	GNB5	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	keine DNA	+	+
30	MDS025	Homo sapiens hypothetical protein MDS025	keine DNA	+	+
3	similar to FLJ00312	Homo sapiens similar to FLJ00312 protein	1910	++	-
	XM_378228				
2	TRIM46	Homo sapiens tripartite motif-containing 46 (TRIM46)	1505	+	-
	NM_025058				
34	CHRNA4	Homo sapiens cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4 (CHRNA4)	keine DNA	+	-
35	CKN1	Homo sapiens Cockayne syndrome 1 (classical)	keine DNA	+	-

Abb.: 26: Die Liste mit den „bait“- und Beute-Konstrukten aus dem YTH-High-Throughput-Ansatz zeigt in Spalte 2 und 3 die durch die NCBI Datenbanken bestätigten Namen und Accession Nr. der zugehörigen Proteine. Spalte 4 gibt die Länge der Nucleotidsequenz des Klons an. Spalte 5 zeigt die zur Gruppe (SD4) zugehörigen Klone. + bzw. ++ gibt an, wie gut die Klone die Wachstums-Reportergene HIS3, URA3 aktivieren konnten. Spalte 6 zeigt die Gruppe (LacZ4) der Klone. + bzw. - gibt Auskunft über die Fähigkeit, die LacZ-Reportergene zu aktivieren, was in einem positiven X-Gal-Test resultierte.

9.3.15 *Qualitative Beschreibung der Interaktionen basierend auf dem X-Gal-Test*

Interaktionspartner mit LBR:

Für das Fänger-Konstrukt LBR-3 (AS 431 – 493) konnte eine positive Interaktion mit dem Beute-Konstrukt FALZ festgestellt werden. Der diploide Hefeklon war in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigte gutes Wachstum (SD4 ++). Der Klon war jedoch nicht in der Lage, die LacZ-Reportergene zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel daher negativ aus (LacZ4 -). Das sprach für eine eher schwache Interaktion der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

Für das Fänger-Konstrukt LBR-4 (AS 577 – 615) konnte ebenfalls eine positive Interaktion mit dem Beute-Konstrukt FALZ festgestellt werden. Der diploide Hefeklon war in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigte mäßig gutes Wachstum (SD4 +). Der Klon war jedoch nicht in der Lage, die LacZ-Reportergene zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel daher negativ aus (LacZ4 -). Das sprach für eine eher schwache Interaktion der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

Interaktionen mit Lamin B1:

Für das Fänger-Konstrukt hLB1_ hLB1 potentielle Ig-Fold Domain (**Seq169**) konnten positive Interaktionen mit den folgenden Beute-Konstrukten festgestellt werden: PHYHIP und C16orf34. Die diploiden Hefeklone waren in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigten im Fall von PHYHIP sehr gutes Wachstum (SD4 ++), und im Fall von C16orf34 gutes Wachstum (SD4 +). Die Klone waren beide nicht in der Lage, die LacZ-Reportergene zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel negativ aus (LacZ4 -). Das sprach für eher schwache Interaktionen der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

Interaktionen mit Lamin B2:

Für das Fänger-Konstrukt LMNB2 _16_Tail+5Hep (**AS 348- 600**) konnte eine positive Interaktion mit dem Beute-Konstrukt APOA1 festgestellt werden. Der diploide Hefeklon war in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigte mäßig gutes Wachstum (SD4 +). Der Klon war jedoch nicht in der Lage, die LacZ-Reportergene zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel daher negativ aus (LacZ4-).

Das sprach für eine eher schwache Interaktion der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

Interaktionen mit Lamin A:

Für das Fänger-Konstrukt hLA_C-Term (**Seq162**) konnten positive Interaktionen mit den folgenden Beute-Konstrukten festgestellt werden: TUSC4, ZFP95, PRKCI, GLB1, ADAMTS10, ZNF235, RBBP4, MCM3AP, PTN, ECH1, MGC15730, HTF9C, CDH23, MASP1 und NGFR. Der diploide Hefeklon war in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigte sehr gutes Wachstum (SD4 ++). Darüber hinaus waren die Klone in der Lage, die LacZ-Reportergene sehr gut zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel daher deutlich positiv aus (LacZ4 ++). Das sprach für eine sehr starke Interaktion der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

Für das Fänger-Konstrukt hLA_C-Term (**Seq162**) konnten positive Interaktionen mit den folgenden Beute-Konstrukten festgestellt werden: COL4A5 und SP110. Die diploiden Hefeklone waren in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigten sehr gutes Wachstum (SD4 ++). Darüber hinaus waren die Klone in der Lage, die LacZ-Reportergene zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel daher positiv aus (LacZ4+). Das sprach für eine eindeutige Interaktion der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

Für das Fänger-Konstrukt hLA_C-Term (**Seq162**) konnten positive Interaktionen mit den folgenden Beute-Konstrukten festgestellt werden: NIPA, FBN3, TUBA3, FLJ14888, SMT3H1, UNC119, ZNF145, PLXNB2, GNB5 und MDS025. Der diploide Hefeklon war in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigte gutes Wachstum (SD4 +). Darüber hinaus waren die Klone in der Lage, die LacZ-Reportergene zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel daher positiv aus (LacZ4 +). Das sprach für eine eindeutige Interaktion der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

Für das Fänger-Konstrukt hLA_C-Term (**Seq162**) konnten positive Interaktionen mit den folgenden Beute-Konstrukten festgestellt werden: TRIM46, CHRNA4 und CKN1. Der diploide Hefeklon war in der Lage, die Wachstumsreportergene HIS3 und URA3 zu aktivieren und zeigte gutes Wachstum (SD4 +). Die Klone waren nicht in der Lage, die LacZ-Reportergene zu aktivieren. Der X-Gal-Test fiel negativ aus (LacZ4-).

Das sprach für eine eher schwache Interaktion der Proteinfragmente innerhalb der Hefezellen.

9.4 Ergebnisse aus dem GST-vermittelten Interaktionstest

9.4.1 GST-vermittelte Überprüfung der Interaktionen

Proteinfragmente, die im *YTH*-Ansatz als Interaktionspartner für LBR identifiziert worden waren, wurden mit Hilfe des GST-vermittelten Interaktionstests *in vitro* auf ihre Interaktionsfähigkeit überprüft. Dazu wurden der LBR-N-Terminus (AS 1-207) als GST-Fusionsprotein exprimiert und an GST-Sepharose gebunden. Das Interaktionspartner-Konstrukt aus dem *YTH*-Ansatz wurde mit Hilfe eines Retikulozyten-Lysat-Systems ^{35}S translatiert. Um eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen zu zeigen, wurde das ^{35}S -Translatat mit der LBR-GST-Fusionsprodukt-GST-Sepharose inkubiert. Um die Interaktion mit der GST-Sepharose selbst auszuschließen, wurde das ^{35}S -translatierte Interaktionsprotein mit der reinen GST-Sepharose inkubiert. Eine Interaktion sollte sich nach einer dreistündigen Inkubation ausgebildet haben. Nicht gebundenes Protein wurde durch Waschen mit HEPES-Puffer entfernt. Durch die Variation der Salzstärke von 150 bis 200 mM NaCl konnte die Bindungsstärke einer Interaktion geprüft werden. Die folgenden Abbildungen zeigen die Autoradiogramme der PAGE-Analysen. In der ersten Spalte wurde jeweils die Probe mit beiden Interaktionspartnern, LBR-GST-Fusionsprotein-GST-Sepharose und dem Lysats des potentiellen Interaktionspartners aufgetragen. In Spalte zweiten wurde eine Probe mit der GST-Sepharose ohne das LBR-GST-Fusionsprotein mit dem translatierten Interaktionspartner aufgetragen. Die dritte Spalte zeigt als Kontrolle die selbe Menge des Lysats des Interaktionspartners wie sie in den beiden anderen Proben eingesetzt worden war.

9.4.2 Überprüfung der Interaktionen mit den Fragmenten aus dem *YTH*-Ansatz

Die **Abb.: 27** zeigt die Interaktionen des LBR-N-Terminus mit den Kandidaten aus dem *YTH*-Ansatz. Für die Proteine PCBP1, UBE21, SF3A2 HP1a konnte unter den Pufferbedingungen mit reinem HEPES-Puffer eine gute Wechselwirkung durch den GST-vermittelten Interaktionstest bestätigt werden. Für das Fragment von SF3A2 konnte auch mit dem verkürzten LBR-N-Terminus LBR (AS 61-207) eine deutliche

Interaktion gefunden und somit die Interaktionsdomäne auf dem LBR-Protein weiter eingegrenzt werden. Die Interaktion mit dem verkürzten N-Terminus wurde nicht für die Proteinfragmente des PCBP1, UBE21 und HP1 α bzw. HP1 β , HIPK2 oder Filamin durchgeführt. Für die Proteinfragmente HP1 α , HIPK2 und Filamin konnte die Wechselwirkung im GST-vermittelten Test nicht bestätigt werden.

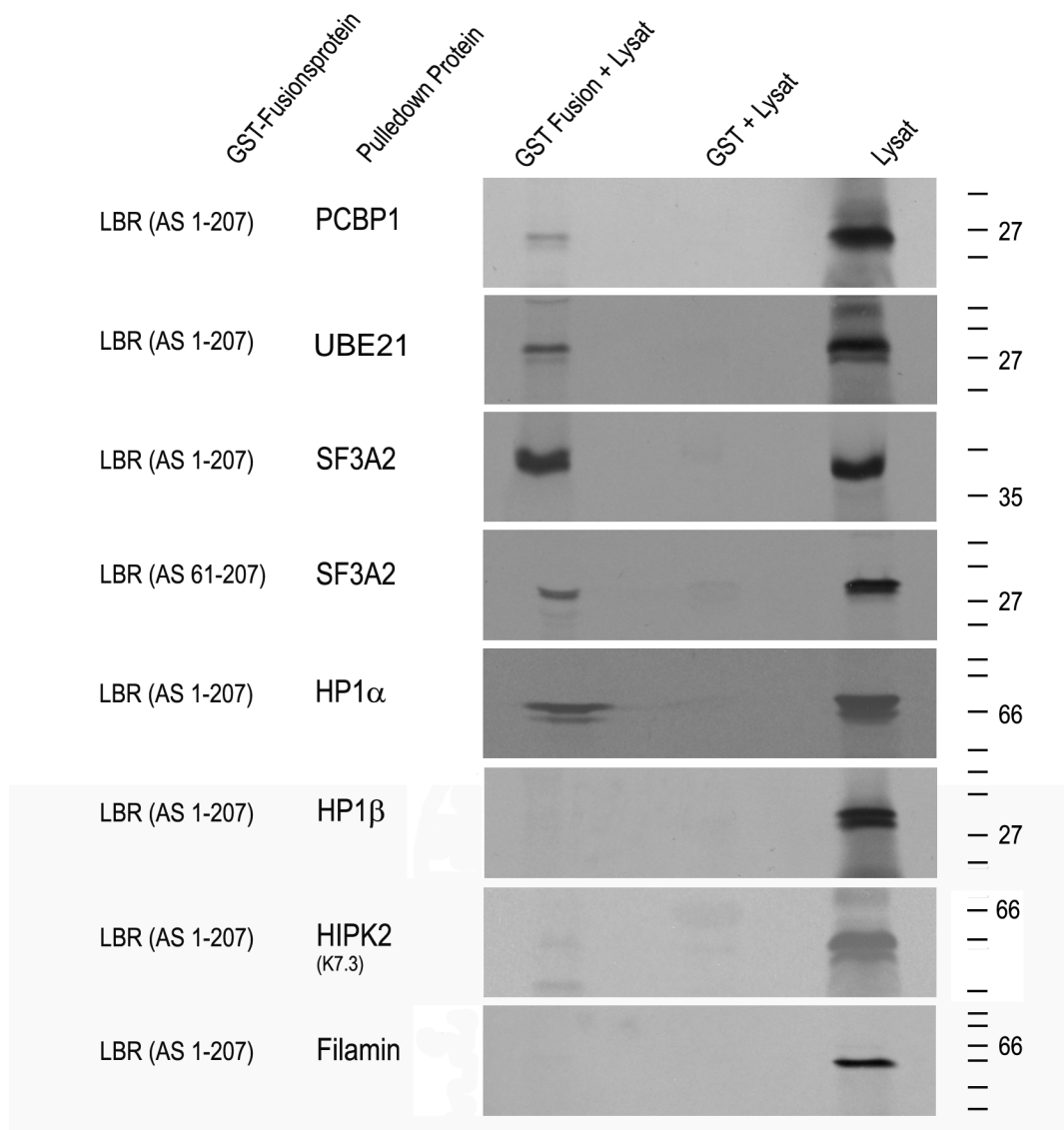


Abb.: 27: Überprüfung der Interaktion mittels des an GST-Sepharose gebundenen Fusionsprotein GST-LBR (AS 1-207) bzw. GST-LBR (AS 61-207). Spalte 1 (GST Fusion + Lysat) zeigt die Interaktionen mit den Proteinfragmenten aus dem YTH-Ansatz: PCBP1 („poly(rC) binding protein 1“) UBE21 („ubiquitin-conjugating enzyme E2I“) SF3A2 („splicing factor 3a, subunit 2“) HP1 α („Heterochromatin protein 1 α “) HP1 β („heterochromatin protein 1 β “) HIPK2 („homeodomain interacting protein kinase 2“) Filamin („filamin A, alpha“). Spalte 2 (GST + Lysat) zeigt, dass keine Interaktion zwischen

der GST-Sepharose und dem jeweiligen ^{35}S -translatierten Proteinfragmenten stattgefunden hat. Spalte 3 (Lysat) zeigt die Menge des eingesetzten ^{35}S -translatierten Proteinfragments. Entsprechende Mengen wurden auch für die Proben aus Spalte 1 und Spalte 2 eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Größenstandards des Proteinmarkers ("Broad Range-7701S"-Marker, New England Biolabs). Alle Experimente wurden mit 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl Puffer durchgeführt.

9.4.3 **GST-vermittelte Überprüfung der Interaktion der HIPK2 mit LBR-N-Terminus**

Mit Hilfe verschiedener Konstrukte für HIPK2 sollte die Interaktion dieses Proteins mit dem LBR-N-Terminus genauer untersucht und eingegrenzt werden. Dazu wurden verschiedene Konstrukte der HIPK2, die wir von Prof. Dr. L. Schmitz erhalten hatten, mit ^{35}S translatiert und mit zwei GST-LBR-N-Terminus Konstrukten, LBR (AS 1-207) und LBR (AS 61-207), inkubiert. Die **Abb.: 28** zeigt, dass die HIPK2 nicht mit dem LBR-N-Terminus LBR (AS 1-207) und auch nicht mit LBR (AS 61-207) interagiert. Für die verkürzten Mutanten, HIPK2 ΔC (AS 1 - 150) und HIPK2 ΔN (AS 151 – 1191), jedoch konnten Interaktionen nachgewiesen werden. Diese Mutanten interagierten sowohl mit LBR (AS 1-207) als auch mit LBR (AS 61-207). Auch die gezielten Punktmutante HIPK2 A25K, bei der die nicht sumoyliert werden konnte, und auch die Punktmutante HIPK2 A221K, bei der die Phosphatase Funktion ausgeschaltet wurde, interagieren beide mit dem LBR-N-Terminus. Bei allen Interaktionen mit den HIPK2 Konstrukten wurde mit einem Niedrigsalzpuffer 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl gewaschen. Die Interaktion der Mutanten HIPK2 ΔC und HIPK2 ΔN hatte auch noch unter den Hochsalz-Waschbedingungen von 20 mM HEPES und 200 mM NaCl Bestand. Die Mutante HIPK2 ΔC zeigte sogar mit dem sehr starken RIPA Puffer noch eine Interaktion. (Diese Daten werden hier nicht gezeigt.)

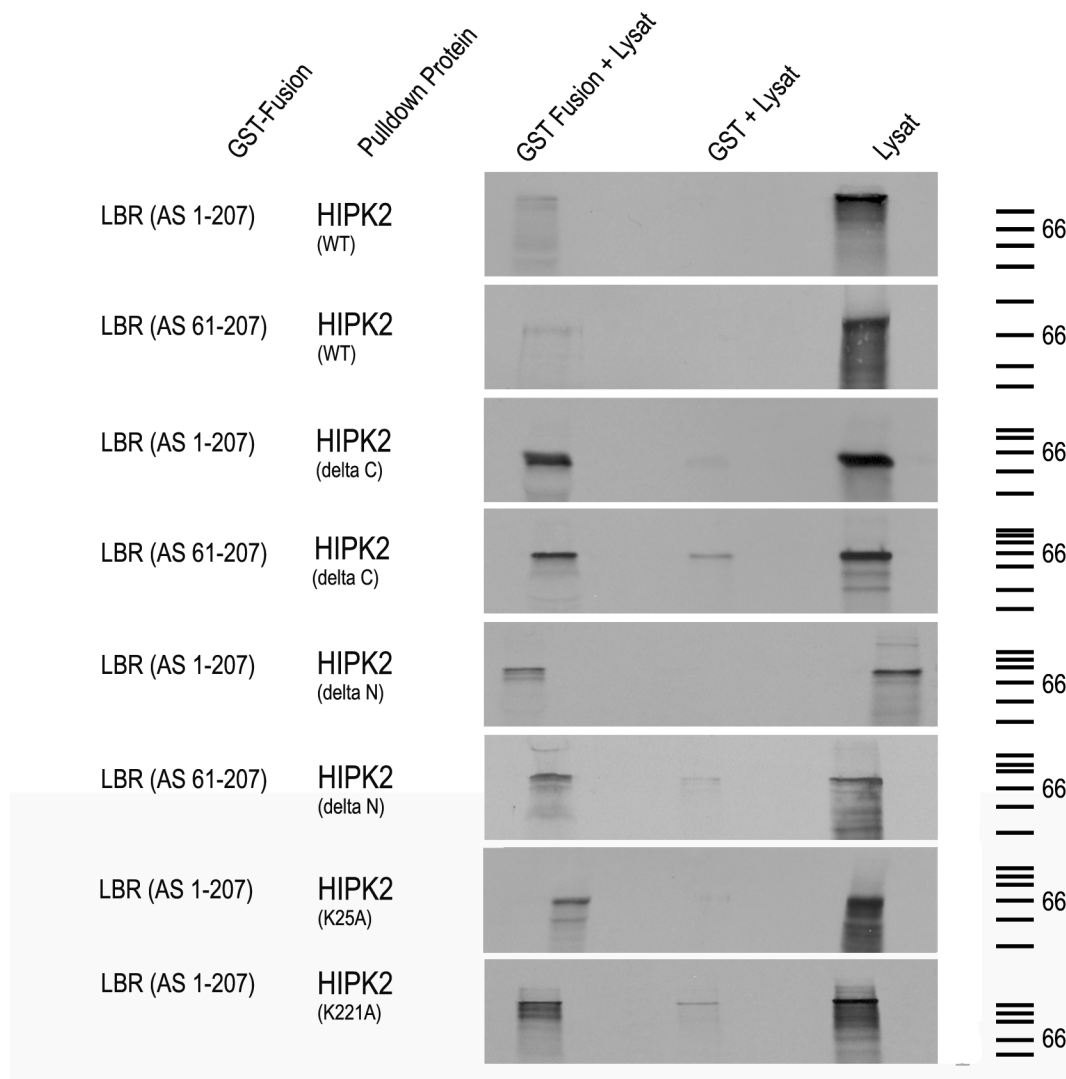


Abb.: 28 Überprüfung der Interaktion mittels des an GST-Sepharose gebundenen Fusionsprotein GST-LBR (AS 1-207) bzw. GST-LBR (AS 61-207). Spalte 1 (GST Fusion + Lysat) zeigt die Interaktionen zw. den Proteinfragmenten der verschiedenen HIPK2 Konstrukte: HIPK2 wt, HIPK2 ΔC , HIPK2 ΔN , HIPK2 K25A und HIPK2 K221A. Spalte 2 (GST + Lysat) zeigt, dass keine Interaktion zwischen dem GST-Beads und dem jeweiligen ^{35}S -translatierten Proteinfragmenten stattgefunden hat. Spalte 3 (Lysat) zeigt die Menge des eingesetzten ^{35}S -translatierten Proteinfragments. Entsprechende Mengen wurden auch für die Proben aus Spalte 1 und Spalte 2 eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Größenstandards des Proteinmarkers ("Broad Range-7701S"-Marker der Firma New England Biolabs). Alle Experimente wurden mit 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl Puffer durchgeführt.

9.4.4 GST-vermittelte Überprüfung der Interaktion von HP1 α , HP1 β und HP1 γ mit dem LBR-N-Terminus

Die Interaktion mit den verschiedenen Proteinen der HP1-Familie konnte ebenfalls mithilfe der Kopplung des LBR-N-Terminus an GST-Sepharose nachgewiesen werden. In **Abb.: 29** wurde die Interaktion zwischen dem GST-LBR-N-Terminus und den im Retikulozytenlysat translatierten Klonen für HP1 α (Klon K 1) gezeigt. Dieser Klon entspricht dem HP1 α Protein in voller Länge. Die Transkription des HP1 β Konstrukts (Klon K 2.6.1) aus dem YHT-Ansatz war weniger effizient und daher ist die Interaktion mit dem LBR-N-Terminus in der Abbildung auch nur extrem schwach.

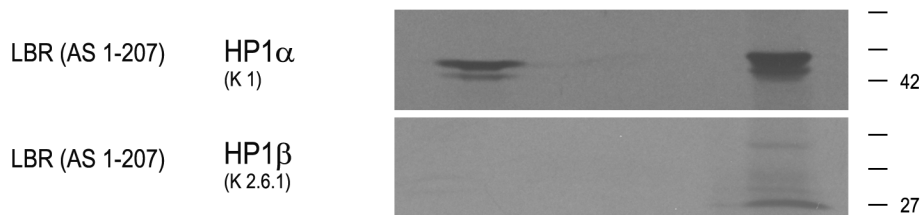


Abb.: 29 Überprüfung der Interaktion mittels des an GST-Sepharose gebundenen LBR (AS 1-207). Spalte 1 (GST LBR (AS 1-207) + Translatat) zeigt die Interaktionen mit den translatierten Teilkonstrukten aus dem YTH-Ansatz von HP1 α , HP1 β . Spalte 2 (GST-Sepharose + Lysat) zeigt, dass keine Interaktion zwischen der GST-Sepharose und dem jeweiligen ^{35}S -translatierten Proteinfragmenten stattgefunden hat. Spalte 3 (Lysat) zeigt die Menge des eingesetzten ^{35}S -translatierten Proteinfragments. Entsprechende Mengen wurden auch für die Proben aus Spalte 1 und Spalte 2 eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Größenstandards des Proteinmarkers ("Broad Range-7701S"-Marker, New England Biolabs). Alle Experimente wurden mit 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl Puffer durchgeführt.

Im YTH-Ansatz war für die Interaktion nur ein Teilfragment von HP1 β verantwortlich. Um die Interaktionen zwischen LBR und den jeweiligen Konstrukten mit voller Länge für HP1 α , HP1 β und HP1 γ zu überprüfen, wurden diese aus entsprechenden Plasmidvektoren, die jeweils einen HA-Anhang enthielten, transkribiert. Die Interaktionen mit dem GST-LBR-N-Terminus konnten nur für HP1 γ eindeutig dargestellt werden (Abb.: 30). Durch den HA-Anhang an den HP1-Proteinen übersteigt das Molekulargewicht das jeweils erwartete Gewicht von ca. 22 kDa.

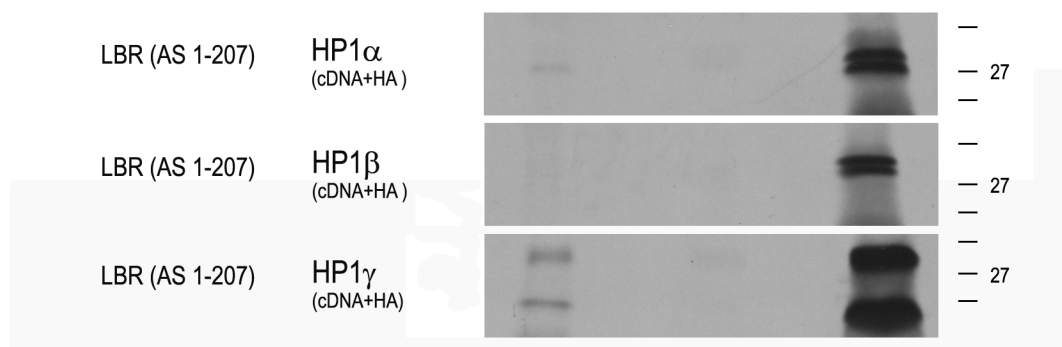


Abb.: 30 Überprüfung der Interaktion mittels des an GST-Sepharose gebundenen LBR (AS 1-207). Spalte 1 (GST LBR (AS 1-207) + Translatat) zeigt die Interaktionen mit den Transkripten der Klon mit voller Länge und HA-Anhang für HP1 α , HP1 β und HP1 γ . Spalte 2 (GST + Lysat) zeigt, dass keine Interaktion zwischen dem GST-Beads und dem jeweiligen 35 S-translatierten Proteinfragmenten stattgefunden hat. Spalte 3 (Lysat) zeigt die Menge des eingesetzten 35 S-translatierten Proteinfragments. Entsprechende Mengen wurden auch für die Proben aus Spalte 1 und Spalte 2 eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Größenstandards des Proteinmarkers ("Broad Range-7701S"-Marker, New England Biolabs). Alle Experimente wurden mit 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl Puffer durchgeführt.

Die Interaktion zwischen dem GST-LBR-N-Terminus und dem HP1 α , dem HP1 β und dem HP1 γ die jeweils in voller Länge vorlagen, konnte in einem weiteren Ansatz gezeigt werden. Hier wurde das gesamte HL60/S4-Zelllysats bzw. das U2OS-Zelllysats mit dem GST-LBR-N-Terminus inkubiert, gewaschen und anschließend die Interaktion mit Hilfe von Antikörpern gegen HP1 α , HP1 β und HP1 γ dargestellt **Abb.: 31**.

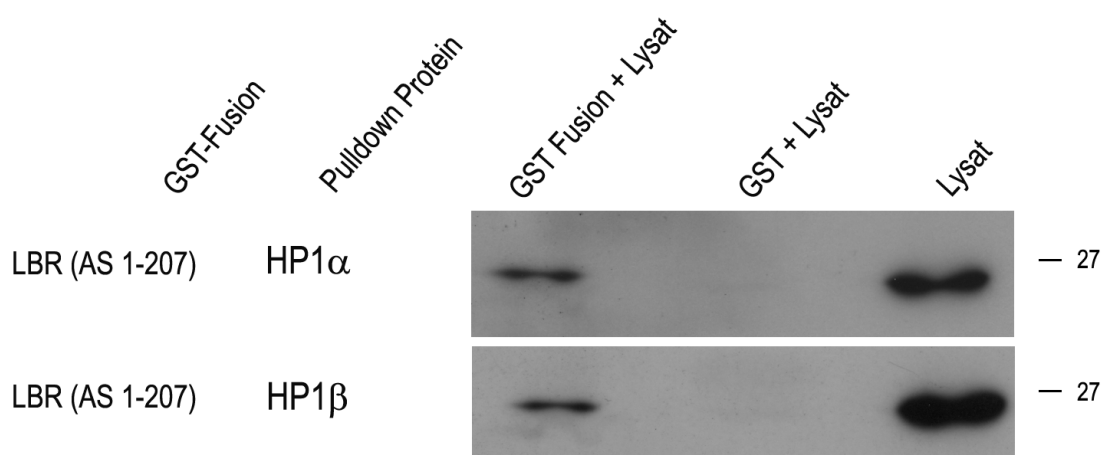


Abb.: 31 Überprüfung der Interaktion mittels des an GST-Sepharose gebundenen Fusionsprotein GST-LBR (AS 1-207). Spalte 1 (GST Fusion + Lysat) zeigt die Interaktionen mit den HP1 α , HP1 β aus HL-60/S4 Zelllysats. Antikörper gegen HP1 α bzw.

HP1β. Spalte 2 (GST + Lysat) zeigt, dass keine Interaktion zwischen dem GST-Beads und dem jeweiligen ³⁵S-translatierten Proteinfragmenten stattgefunden hat. Spalte 3 (Lysat) zeigt die Menge des eingesetzten Zelllysats aus HL-60/S4 Zellen. Entsprechende Mengen wurden auch für die Proben aus Spalte 1 und Spalte 2 eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Größenstandards des Proteinmarkers ("Broad Range-7701S"-Marker, New England Biolabs). Alle Experimente wurden mit 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl Puffer durchgeführt.

9.4.5 GST-vermittelte Überprüfung der Interaktion von „fetal Alzheimer antigen“ (FALZ) mit dem LBR-N-Terminus

Im *YTH- High-Throughput*-Ansatz, bei dem eine gewebespezifische cDNA-Bibliothek aus zerebralen Faktoren mit dem LBR-Nerminus durchsucht worden war, wurde das „fetal Alzheimer antigen“ (FALZ) als einziger Interaktionspartner für den LBR-N-Terminus gefunden. Nach der Translation des FALZ c-DNA-Fragments (AS 1-272) im Retikulozytenlysatsystem wurde mit Hilfe des GST-vermittelten Interaktionstests eine deutliche Interaktion mit dem LBR-N-Terminus bestätigt. Daraufhin wurden weitere Domänen des LBR als GST-Konstrukte exprimiert und für den GST-vermittelten Interaktionstest mit dem FALZ-Fragment verwendet. Neben dem N-Terminus LBR (AS 1-207) zeigte auch der C-Terminus LBR (AS 577-615) eine deutliche Interaktion. Eine deutliche, wenn auch schwächere Interaktion konnte auch für die Domäne LBR (AS 344-385) zwischen den Transmembrandomänen gezeigt werden. Entgegen dem Ergebnis aus dem *YTH-high-throughput*-Ansatz zeigte die Domäne LBR (AS 431-493) keine Interaktion mit dem FALZ-Fragment. Die Domäne LBR (61-207) zeigte keine Interaktion, wodurch die Interaktion auf die N-terminale Domäne LBR (AS 1-61) eingegrenzt werden konnte.

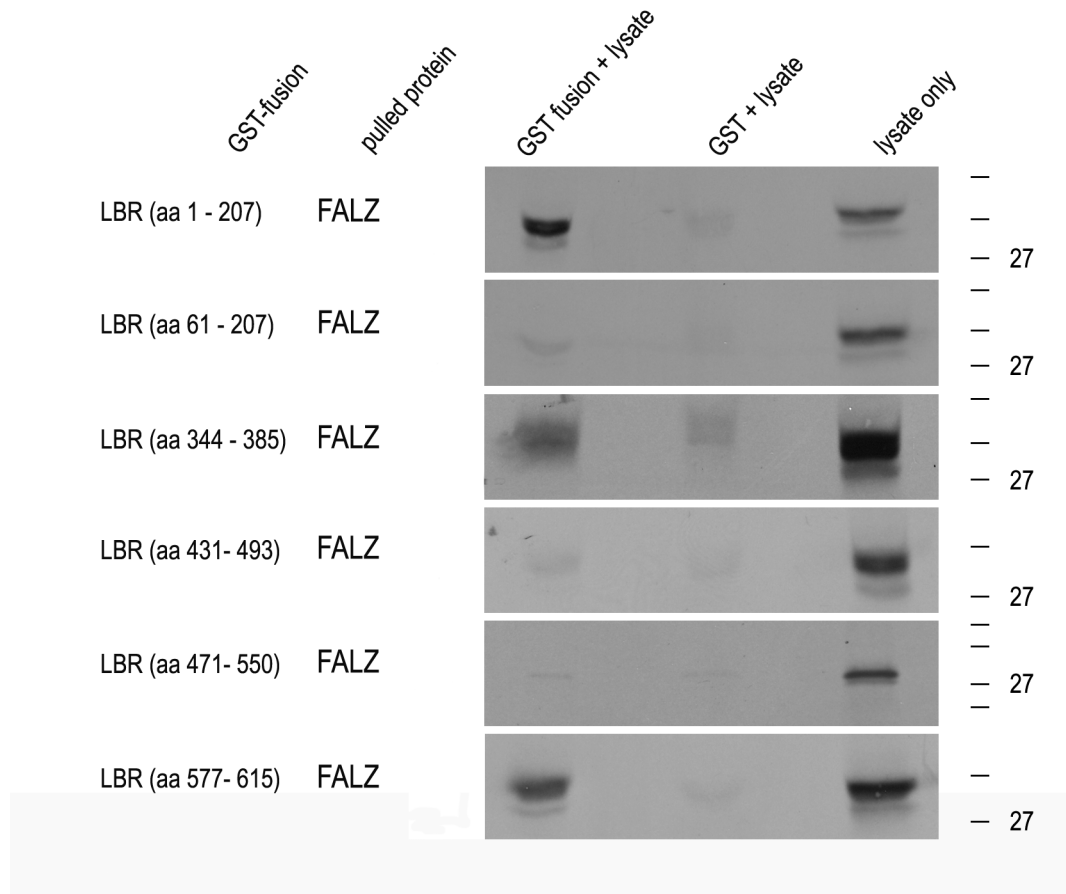


Abb.: 32 Überprüfung der Interaktion mittels des an GST-Sepharose gebundenen Fusionsprotein von GST-LBR (AS 1-207), GST-LBR (AS 61-207), GST-LBR (AS 344-385), GST-LBR (AS 431-493), GST-LBR (AS 471-550) und GST-LBR (AS 577-615). Spalte 1 (GST Fusion + Lysat) zeigt die Interaktionen mit dem Proteinfragment für „fetal Alzheimer antigen“ (FALZ) aus dem YTH-high-throughput-Ansatz. Spalte 2 (GST + Lysat) zeigt, dass keine Interaktion zwischen der GST-Sepharose und den ³⁵S-translatierten Proteinfragmenten stattgefunden hat. Spalte 3 (Lysat) zeigt die Menge des eingesetzten ³⁵S-translatierten FALZ-Proteinfragments. Entsprechende Mengen wurden auch für die Proben aus Spalte 1 und Spalte 2 eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Größenstandards des Proteinmarkers („Broad Range-7701S“-Marker, New England Biolabs). Alle Experimente wurden mit 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl Puffer durchgeführt.

9.4.6 GST-vermittelte Überprüfung der Interaktion mit dem LMNA-C-Terminus

Im YTH- High-Throughput-Ansatz, der für den LMNA-C-Terminus (AS 562-664) innerhalb einer gewebespezifischen c-DNA-Bibliothek durchgeführt worden war erbrachte insgesamt 32 Interaktionspartner. Aus dieser Gruppe lagen fünf Kandidaten als Konstrukte mit voller Länge für das entsprechende Protein vor. Diese

Konstrukte wurden in entsprechende Transkriptionsvektoren umklontiert und mit Hilfe von kaninchen Retikulozytenlysat translatiert. Anschließend konnte mit Hilfe des GST-vermittelten Interaktionstests eine deutliche Interaktion für diese fünf Proteinfragmente dargestellt werden: „*Homo sapiens Cockayne syndrome 1*“ (CKN1), „*Homo sapiens pleiotrophin*“ (PTN), „*Homo sapiens retinoblastoma binding protein 4*“ (RBBP4), „*Homo sapiens tumor suppressor candidate 4*“ (TUSC4) und „*Homo sapiens tumor suppressor candidate 3*“ (TUBA3).

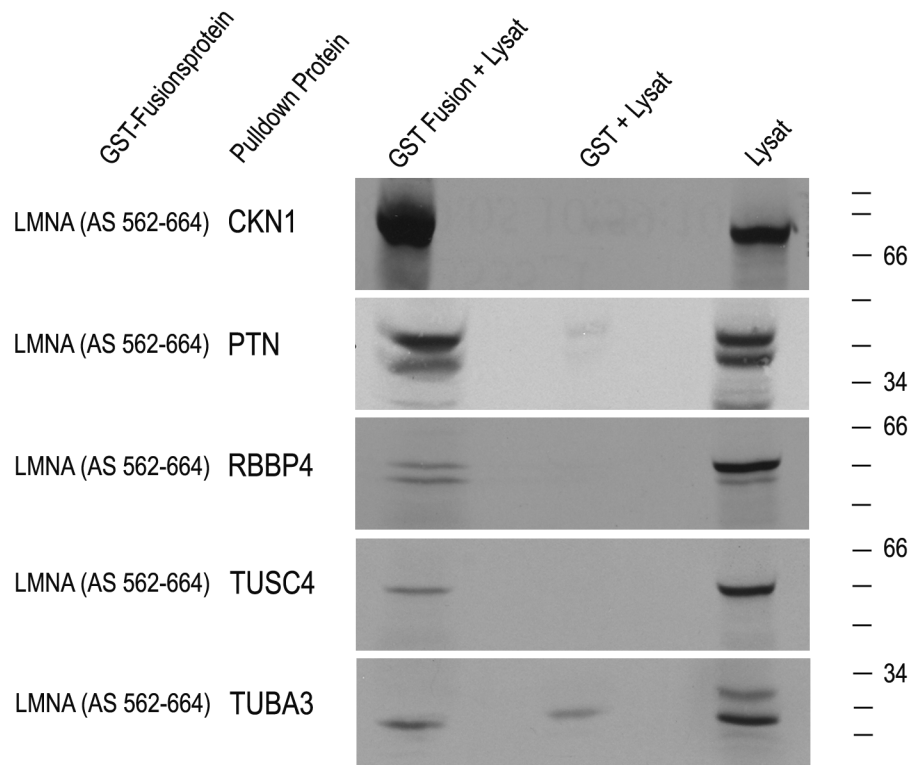


Abb.: 33 Überprüfung der Interaktion mittels des an GST-Sepharose gebundenen Fusionsprotein von GST-LBR (AS 1-207), GST-LBR (AS 61-207), GST-LBR (AS 344-385), GST-LBR (AS 431-493), GST-LBR (AS 471-550) und GST-LBR (AS 577-615). Spalte 1 (GST Fusion + Lysat) zeigt die Interaktionen mit dem Proteinfragment für CKN1, PTN, RBBP4, TUSC4 und TUBA3 aus dem YTH-high-throughput-Ansatz. Spalte 2 (GST + Lysat) zeigt, dass keine Interaktion zwischen dem GST-Beads und den ³⁵S-translatierten Proteinfragmenten stattgefunden hat. Spalte 3 (Lysat) zeigt die Menge des eingesetzten ³⁵S-translatierten FALZ-Proteinfragments. Entsprechende Mengen wurden auch für die Proben aus Spalte 1 und Spalte 2 eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Größenstandards des Proteinmarkers ("Broad Range-7701S"-Marker, New England Biolabs). Alle Experimente wurden mit 20 mM HEPES und 100 -150 mM NaCl Puffer durchgeführt.

10 Diskussion

Die Kernhüllenproteine LBR und Lamin A besitzen die Fähigkeit, die Kernmorphologie und auch die Organisation von Chromatin zu beeinflussen. Diese Veränderungen findet man während der Differenzierung von HL-60/S4 Zellen zu Granulozyten. Dieser Prozess geht bei einer gesteigerten Expression von LBR mit massiver Lobulierung der Zellkerne, zusammen mit einer leichten Anreicherung an Heterochromatin an der Kernhülle einher. Zudem werden Schichten von Chromatin, das von der Kernhüllenmembran umgeben ist, ausgebildet - die sogenannten *Envelope limited chromatin sheets* (ELCS) (Olins, Herrmann et al. 2001; Olins, Buendia et al. 1998). Ähnliche Effekte bezüglich der Kernhülle zeigen auch die Kerne in Zellen von Patienten mit dem Hutchison-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS). Ausgelöst durch den Mangel an funktionsfähigem Lamin A findet man neben der gelappten Kernmorphologie auch Chromatinveränderungen im Inneren des Kerns (Shumaker, Dechat et al. 2006). Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern für die Proteine LBR und Lamin A, die an der Umstrukturierung der Kerne beteiligt sein könnten, haben wir *Yeast-Two-Hybrid* (YTH)-Untersuchungen zur Interaktion von Proteinen in genetisch modifizierten Hefen durchgeführt. Verschiedene Teilabschnitte von LBR, Lamin A sowie Lamin B1 und Lamin B2 wurden als Fängerkonstrukte verwendet. Die cDNA-Bibliothek für die Suche nach Interaktionspartnern für den LBR-N-Terminus haben wir aus HL-60/S4 Zellen während der Differenzierung zu Granulozyten gewonnen. Für einen weiteren YTH-Ansatz in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wanker am Max Delbrück Zentrum in Berlin wurde eine konstitutiv aus zerebralen Faktoren zusammengesetzte cDNA-Bibliothek verwendet. Somit wechselten wir aus einem zellsepezifischen Kontext in ein spezialisiertes Gewebe wobei die Auswahl der etwa 5000 Faktoren hauptsächlich Klone umfasste, die das jeweilige Protein in voller Länge darstellten. In diesem Ansatz konnten wir einige wenige aber interessante Interaktionspartner für die Teilfragmente für LBR, Lamin B1 und Lamin B2 identifizieren. Eine größere Anzahl von Interaktionspartnern wurde für das 50 AS große Fragment von Lamin A gefunden, das der fehlenden C-terminalen Domäne der Lamin A-Mutante in Zellen HGPS-Patienten entspricht. Interaktionen, die mit

diesem Teilfragment gefunden werden, können in Progeriezellen nicht mehr stattfinden und könnten somit deren frühzeitige Alterung verursachen.

10.1 Einfluss einiger Kernhüllenproteine auf die Kernmorphologie während der Differenzierung der HL60/S4 Zellen

Mit Hilfe der *Real-Time-PCR* (RT-PCR) Methode haben wir den Verlauf der Expression der mRNA verschiedener Kernhüllenproteine während der Retinsäure (RA) induzierten Differenzierung der promyeloiden Zelllinie HL-60/S4 zu Granulozyten analysiert. Dabei wurde die Änderung der mRNA-Menge für LBR, LMNA, LMNB1, LMNB2, VIM und ACTB über einen Zeitraum von fünf Tagen nach der Induktion mit RA untersucht. Aus der Expressionsstärke sollte der Einfluss dieser Faktoren mit der Lobulierung von differenzierenden Kernen korreliert werden. Die Auswertung der RT-PCR Daten ist so normiert, dass nicht die absoluten Mengen an mRNA in den Zellen dargestellt wird, sondern lediglich die Änderung der mRNA-Synthese im Vergleich zum Ausgangswert am Tag Null für jedes der Gene bestimmt wird. Die Graphen lassen somit Rückschlüsse auf den Verlauf der Entwicklung der mRNA-Menge im Laufe der Differenzierung zu. Für die Kernhüllenproteine Lamin A, Lamin B1 und Lamin B2 finden wir zunächst eine nur geringe Zunahme, gefolgt von einer rückläufigen Entwicklung der mRNA-Menge. Somit kann hier eine gute Übereinstimmung zwischen der Entwicklung der mRNA-Menge und der Entwicklung der proteinbiochemisch bestimmten Proteinmengen in differenzierenden HL-60/S4 Zellen festgestellt werden (Olins, Herrmann et al. 2001). Dagegen zeigt die mRNA Entwicklung während der Differenzierung zu Makrophagen nach Induktion mit Tetrathorbolester deutliche Abweichungen von den Proteinmengen in den proteinbiochemischen Untersuchungen. Die mRNA Analyse zeigt für die Entwicklung von Makrophagen, dass sich die Menge der LBR-mRNA innerhalb der fünf Tage halbiert. Auch der Gehalt der Zellen an mRNA von Lamin B1 und Lamin B2 nimmt deutlich ab, wohingegen beim Gehalt der Proteine für LBR, Lamin B1 und Lamin B2 eine Zunahme verzeichnet werden kann. Unverkennbar zeigen mRNA-Menge sowie Proteinmenge für Lamin A eine extreme Zunahme während der Differenzierung zu Makrophagen. Aus den RT-PCR Daten lässt sich somit ableiten, dass die Auslappung der Kerne mit dem Anstieg der LBR-mRNA bei gleichzeitiger Abnahme der Lamin A-mRNA einhergeht. Umgekehrt geht die Abrundung der Kerne während

der Differenzierung zu Makrophagen mit dem Anstieg der Lamin A-mRNA und der deutlichen Abnahme der LBR-mRNA einher. Bezüglich der Abweichungen zwischen den beiden Untersuchungsmethoden ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Entwicklung der mRNA-Expression nicht notwendigerweise in direkter Korrelation zum Gehalt eines Proteins in der Zelle steht. Dieser wird nicht nur durch die Expression der mRNA, sondern auch durch die Abbaurate des betreffenden Proteins in der Zelle bestimmt. Somit können tatsächlich Abweichungen zwischen Protein- und mRNA-Gehalt in Zellen auftreten. Beide Untersuchungsmethoden belegen jedoch, dass während unterschiedlicher Differenzierungswege ein gänzlich anderer relativer Gehalt an Laminen sowie an LBR, sowohl auf der Proteinebene als auch auf der mRNA-Ebene vorliegt und so an der Ausbildung einer charakteristisch veränderten Kernmorphologie - ovoide Kerne in Makrophagen versus gelappte Kerne in Granulozyten - mitwirkt. Übereinstimmend mit der Hypothese von Olins und Herrmann (2001) liegt die Annahme nahe, dass weitere Faktoren für die Organisation dieser drastischen Prozesse an der Kernhülle sowie in der Chromatinorganisation verantwortlich sein sollten. Faktoren, die zur Lappung der Kerne beitragen, sollten in einer cDNA-Bibliothek aus differenzierenden HL-60/S4 Zellen nach der Induktion mit RA zu finden sein. Da sich bereits einen Tag nach der Induktion die Menge der LBR-mRNA in HL-60/S4 Zellen deutlich erhöht hat und nach zwei Tagen etwas mehr als verdoppelt hat, folgerten wir, dass während dieses Zeitraums auch die mRNA-Menge für potentielle Interaktionspartner für LBR erhöht sein sollte. Somit erfolgte die Präparation der Gesamt-RNA zur Herstellung der cDNA-Bibliothek für die Suche nach neuen, die Kernhülle beeinflussenden Faktoren aus HL-60/S4 Zellen zwei Tage nach der Induktion mit RA.

10.2 Einfluss zytoplasmatischer Zytoskelettproteine auf die Kernmorphologie während der Differenzierung der HL-60/S4 Zellen

Auch für die Veränderung der mRNA-Menge für Vimentin und Aktin lassen sich anhand der RT-PCR-Daten starke Unterschiede beim Vergleich der beiden Differenzierungswege feststellen. Gleichzeitig mit einer Zunahme der LBR-mRNA scheint die Abnahme der mRNA des Zytoskelettproteins Vimentin zusammen mit einer Verdoppelung der Aktin-mRNA die Lobulierung der Kernhülle zu begünstigen. Eine Abnahme an LBR bei gleichzeitiger Zunahme von Lamin A und massiver

(10facher) Zunahme der Vimentin-mRNA hingegen scheint zur Ausbildung einer stabilen, ovoiden Kernform beizutragen, wie sie bei Makrophagen zu beobachten ist. Aktin verzeichnete hierbei nur eine schwache Zunahme und scheint deshalb keine nennenswerte Rolle zu spielen. Schon in früheren Studien wurde während der RA-induzierten Differenzierung von HL-60/S4 Zellen eine drastische Abnahme für Vimentin (Olins, Herrmann et al. 2000) und eine deutliche Zunahme für Aktin gefunden (Meyer und Howard 1983). Auch in SW-13 Zellen wurde die Lobulierung der Kerne in Abwesenheit von Vimentin beobachtet (Kouklis, Merdes et al. 1993), (Sarria, Lieber et al. 1994). So unterstützen die Daten dieser Arbeit die These, dass sich das Vimentin-Netzwerk stabilisierend auf eine runde Kernmorphologie auswirkt und andererseits die Abwesenheit von Vimentin und Lamin A morphologische Veränderungen des Kerns begünstigen. Frühere Untersuchungen an HL-60/S4 Zellen hatten gezeigt, dass die Zerstörung der Aktinfilamente mit Hilfe des Zellgifts Cytochalasin D keinen Einfluss auf die Lobulierung der Kerne hatte (Olins und Olins 2004). Andererseits konnte durch die Zerstörung der Mikrotubuli mittels des Zellgifts Nocodazol die Lappung der Kerne in differenzierenden HL-60/S4 Zellen verhindert werden. Die Proteine des LINC-Komplex stellen eine Verbindung zwischen zytoplasmatischen Zytoskelettproteinen wie Vimentin und Aktin und der Kernhülle dar, die sich bis zur extrazellulären Matrix fortsetzt (Crisp, Liu et al. 2006). So wird die nanomechanische Kommunikation zwischen Kerninnerem und Zytoskelett ermöglicht. Im Gegensatz zu den Makrophagen fehlen in den Granulozyten neben Vimentin weitere der am LINC-Komplex beteiligten Komponenten, wie Nesprin 1 giant, Nesprin 2 giant, SUN1 und Plectin (Olins, Hoang et al. 2009). Zusammengefasst unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, dass Proteine des Zytoskeletts die Kernmorphologie beeinflussen können.

10.3 Neue Interaktionspartner für LBR und Lamin A mithilfe von Interaktionsstudien im *YTH*-Ansatz

Für die Suche nach neuen Interaktionspartnern für die Kernhüllenproteine LBR und Lamin A verwendeten wir eine Proteom Untersuchungsmethode: Die Interaktionssuche im *YTH*-System. Durch die Aufnahme einer Zelltyp-spezifischen cDNA-Bibliothek vermag man mit Hilfe des Hefesystems gleichzeitig eine Vielzahl von Interaktionen für einen Interaktionspartner zu überprüfen. In unseren *YTH*-

Ansätzen mit einer cDNA-Bibliothek aus differenzierenden HL-60/S4-Zellen fanden wir neben den neuen Faktoren jeweils auch das Protein HP1 α , das als bereits bekannter Interaktionspartner für LBR gilt (Ye, Q. und H. J. Worman 1996). Dies spricht wiederum für die Reproduzierbarkeit der Methode. Durch die Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus differenzierenden HL-60/S4 Zellen erhielten wir eine Zelltyp-spezifische Auswahl an Interaktionspartnern. Dies ermöglichte es uns, speziell nach Interaktionspartnern zu suchen, die an den Umgestaltungsprozessen im Kern während der Differenzierung der HL-60/S4 Zellen beteiligt sind. Dennoch unterliegt das YTH-System einer gewissen Einschränkung, was die Vollständigkeit der potentiellen Interaktionspartner anbelangt. Denn nicht alle potentiellen Interaktionen, die unter physiologischen Bedingungen stattfinden, kommen unter den Bedingungen in Hefe auch tatsächlich zustande.

In einem zweiten Ansatz verwendeten wir eine cDNA-Bibliothek, die aus etwa 5000 zerebralen Faktoren zusammengesetzt war. Im Gegensatz zu der cDNA-Bibliothek, die aus der differenzierenden promyeloiden Zelllinie stammte, umfasste diese Bibliothek Faktoren, die in einem spezialisierten Gewebe von Bedeutung sind. Der YTH-Ansatz, im sogenannten *high-throughput*-Verfahren machte es möglich, alle Faktoren der cDNA-Bibliothek auf ihre Interaktionsfähigkeit untereinander zu überprüfen. Die Insgesamt 31 potentiellen Interaktionspartner für Lamin A, einem für LBR, zwei für Lamin B1 und einem für Lamin B2 zeigen, dass durch diese Methode viele gewebespezifische Interaktionspartner identifiziert werden können. Aus diesen Daten lassen sich mittels einer Computer-basierten Auswertung aus allen Interaktionen aller teilnehmenden Faktoren Protein-Interaktions-Netzwerke erstellen. Zur biochemischen Verifizierung der potentiellen Interaktionspartner wechselten wir aus dem Hefesystem auf einen GST-vermittelten Interaktionstest. Hierfür wurden die Interaktionspartner in einem Retikulozytenlysat-System, das aus Kaninchen gewonnen wurde, translatiert und die Interaktion anschließend unter physiologischen Pufferbedingungen getestet. Diese Untersuchungen lassen auf eine funktionelle Interaktion richtig gefalteter Proteine schließen, bedürfen jedoch der weiteren Verifizierung. Für einzelne Interaktionspartner wurden zur Verifizierung der Interaktion *in vivo* bereits erste immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation in lebenden Zellen durchgeführt. Durch eine Ko-Immunpräzipitation mit LBR aus Zellextrakt könnten diese Interaktionen weiter verifiziert werden.

10.4 Interaktionen für LBR aus der cDNA-Bibliothek aus einer zu Granulozyten differenzierenden promyeloischen Zelllinie

10.4.1 Interaktion von LBR mit der humanen „Homeodomain interacting protein kinase 2“ (HIPK2)

Sowohl die Rücktransformation *in das YTH-System* als auch die GST-vermittelten Interaktionstests dieser Arbeit zeigen, dass *in vitro* eine zum Teil starke Interaktion zwischen dem LBR-N-Terminus und verschiedenen Konstrukten des Proteins „**Homo sapiens homeodomain interacting protein kinase 2**“ (HIPK1) vorliegt. Erstaunlich ist, dass der GST-vermittelte Interaktionstest zwischen HIPK2 und dem LBR-N-Terminus unter physiologischen Pufferbedingungen nur eine schwache Interaktion zeigt. Die beiden Teilkonstrukte HIPK2 Δ C mit der Kinasedomäne und HIPK2 Δ N ohne die Kinasedomäne zeigen beide eine starke Interaktion. Dasselbe gilt für eine Mutante von HIPK2 (K221A), deren Phosphatase-Aktivität inaktiv ist, und für die nicht sumoylierbare Mutante HIPK2 (K25A). Dies verstärkte unsere Vermutung, dass eine Bindung auch *in vivo* in Betracht gezogen werden kann. Denn die starke Bindung der LBR-Fragmente legt nahe, dass die Bindung der HIPK2 *in vivo* von Modifikationen wie Sumoylierung oder Phosphorylierung oder einer optimalen Faltung beider Bindungspartner abhängig sein könnte. Die Recherche zur Proteinfamilie der HIP-Kinasen ergab, dass HIPK2 das zur Zeit am besten charakterisierte Mitglied der hoch konservierten Familie der „*homeobox interacting kinases 1-4*“ darstellt (Kim, Choi et al. 1998). Die HIPK2 besitzt eine N-terminale Kinasedomäne, des weiteren eine SUMO-Bindedomäne, eine Bindedomäne für Transkriptionsfaktoren mit Homeodomänen und zwei PEST-Domänen (Gresko, Moller et al. 2005). HIP-Kinasen und speziell die HIPK2, sind an der Regulation einer Vielzahl von Kernprozessen beteiligt. HIPK2 spielt eine Rolle bei der Genregulation, bei der Proliferation, bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden sowie beim Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau. Die HIPK2-vermittelte Genregulation wirkt unter anderem als Auslöser für die Differenzierung und Entwicklung sowie für den apoptotischen Zelltod (Calzado, Renner et al. 2007; Rinaldo, Siepi et al. 2008). Die Aktivität der HIPK2 ist abhängig von ihrer jeweiligen Lokalisation in den Subkompartimenten des Kerns. Bezüglich der Lokalisation der HIPK2 in der Zelle ergab die Recherche, dass die HIPK2 punktförmig verteilt ist und dass sie teilweise mit PML-Körperchen

kolokalisiert. Weitere HIPK2-Anreicherungen konnten keiner bekannten Struktur zugewiesen werden und werden daher als HIPK-Domänen bezeichnet. Auch durch die Sumoylierung mittels des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms UBC9 wird ihre Lokalisation im Kern nicht verändert (Kim, Choi et al. 1999). Kleinere Mengen der HIPK2 werden auch im Nukleoplasma und im Zytoplasma gefunden (Moller, Sirma et al. 2003). Unsere Versuche, eine Kolokalisation von LBR mit FLAG-HIPK2 in transfizierten Zellen zu untersuchen, zeigten keinen Erfolg, da sich das FLAG-HIPK2-Konstrukt schädigend auf die Zellen auswirkte. Möglicherweise wäre es sinnvoll, unter Verwendung eines weniger toxischen Konstruktes das Verteilungsmuster der Proteine in synchronisierten Zellen in einer anderen Zellzyklusphase zu untersuchen. Eine Phosphorylierung von LBR durch HIPK2 ist generell denkbar. So enthält der LBR-N-Terminus nicht nur eine Reihe von Phosphorylierungsmotiven, sondern wird auch durch die RS-Kinase sowie durch die p34^{cdc2} Kinase phosphoryliert (Simos, Maison et al. 1996; Nikolakaki, Meier et al. 1997). Für die HIPK2 wurde eine Vielzahl von Interaktionspartnern beschrieben (Rinaldo, Siepi et al. 2008). Unsere ersten Versuche, die Interaktion mit endogenem LBR in HEK95 Zellen nach der Transfektion eines HIPK2-Konstrukts und Koimmunpräzipitation nachzuweisen, waren ebenfalls fehlgeschlagen. Möglicherweise könnte eine Koimmunpräzipitation jedoch durch chemische Vernetzung der gebildeten Komplexe oder die Verwendung anderer Zellen verbessert werden.

10.4.2 Interaktion von LBR mit Chromatin organisierenden Proteinen der HP1-Familie

Unter den Hefe-Klonen in unserem YTH-Ansatz konnten wir das Heterochromatin Protein 1 α (HP1 α) in beiden Ansätzen mit etwa 50% aller Klone als den häufigsten Klon identifizieren. HP1 α und HP1 γ waren bereits von Ye und Worman als LBR-Interaktionspartner bei der Suche nach Interaktionspartnern mittels eines YTH-Ansatzes innerhalb einer HeLa cDNA-Bibliothek identifiziert worden (Ye und Worman 1996). Die Bestätigung der Interaktion mit HP1 α kann als Qualitätsmerkmal für unseren YTH-Ansatz angesehen werden. Durch die Verwendung unseres verkürzten N-terminalen Bindungskonstruktes LBR (AS 61-207), konnten wir die Interaktion genauer eingrenzen. Damit bestätigen wir die Untersuchungen von (Ye, Callebaut et

al. 1997), in denen die zweite globuläre Domäne von LBR als Interaktionsdomäne mit HP1 α beschrieben wird. Darüber hinaus fanden wir in unserem YTH-Ansatz ein Fragment, das der Chromoshadow-Domäne (CSD) von HP1 β entspricht als Interaktionspartner mit dem LBR-N-Terminus. Die CSD gilt in HP1 α als entscheidende Interaktionsdomäne für LBR (Ye, Callebaut et al. 1997). Die Interaktionen für alle drei HP1-Proteine konnten wir durch verschiedene GST-vermittelte Interaktionstests bestätigen. Somit konnten wir in dieser Arbeit zum ersten Mal die Interaktion von LBR mit allen drei Proteinen der HP1-Familie zeigen, was aufgrund der hohen Sequenzhomologie der CSD in allen drei HP1-Proteinen naheliegt. HP1 α und HP1 β gehören mit HP1 γ zur hochkonservierten Proteinfamilie der Heterochromatin Proteine (James, 1986). Sie lokalisieren gehäuft an typischen Heterochromatinregionen wie den Zentromeren und den Telomeren und wechseln dort schnell zwischen einem an Chromatin gebundenen und dem frei diffundierenden Zustand (Dinant und Luijsterburg 2009). HP1 α und HP1 β werden vor allem in Bereichen des perizentrischen Chromatins gefunden, HP1 γ entlang der Chromosomenarme (Grimes, Babcock et al. 2004). Es wird angenommen, dass das hochkonservierte Protein eine wichtige Rolle bei der Stilllegung und Beibehaltung stillgelegter Chromatinregionen und somit für die epigenetische Regulation spielt (Review siehe Grewal und Elgin 2002). Durch die Interaktion mit allen drei HP1-Proteinen konnte in dieser Arbeit die Bedeutung von LBR als möglichem Kandidaten für die Chromatinorganisation an der Kernhülle unterstrichen werden.

10.4.3 Interaktionen von LBR mit Proteinen, die dem Spleißprozess assoziiert sind

Drei der innerhalb des YTH-Ansatzes unter Verwendung einer HL-60/S4 cDNA-Bibliothek gefundenen Interaktionspartner für LBR gelten als Proteine, die dem Spleißprozess zugeordnet werden können. Dazu gehören das „**Poly (rC) binding protein 1**“ (PCBP1), der „**U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2**“ (U2AF) sowie der „**Splicing factor 3a, subunit 2**“ (SF3A2). Wir konnten die Interaktion der drei Proteine mit dem LBR-N-Terminus auch mittels des GST-vermittelten Interaktionstests bestätigen. Um weitere Hinweise auf eine Interaktion *in vivo* zu erhalten, könnten Ko-Immunpräzipitationen aus Zellkulturzellen durchgeführt werden. Für PCBP1 wurde publiziert, dass seine Lokalisation im Kern durch ein

Kernlokalisationssignal ermöglicht wird, was eine Interaktion mit LBR *in vivo* ermöglichen würde. In HeLa-Zellen wird eine Ko-Lokalisation von endogenem PCBP1 mit dem für Speckles typischen SC35-Protein gefunden (Meng, Rayala et al. 2007; Chkheidze und Liebhaber 2003). Im Zytoplasma übernimmt PCBP1 die Funktion eines Chaperons beim Beladen von Ferritin mit Eisen (Shi, Bencze et al. 2008). Auch das Protein **U2AF** ist am Spleißprozess beteiligt. Es wird bei der Bindung von U2 snRNP an die pre-mRNA benötigt (Kielkopf, Rodionova et al., 2001). Der Spleißfaktor **SF3A2**, auch bekannt als SAP62, ist Teil des Spleißosoms. Ein Zinkfingermotiv ermöglicht die Bindung an Nukleinsäure (Bennett und Reed 1993). Eine erste Verbindung zwischen LBR und Proteinen des Spleißprozesses wurde durch die Assoziation von LBR an p32, auch bekannt als *SF2-associated protein*, hergestellt (Simos und Georgatos 1994). Die *Speckles*, auch SC35-Domänen genannt, sind Orte der Lagerung von Spleißfaktoren (Lamond und Spector 2003). Auch Cajal-Körperchen enthalten einige der Spleißfaktoren, die für den Spleißprozess zu den Orten der Transkription rekrutiert werden (Misteli, Caceres et al. 1997; Shopland, Johnson et al. 2003). Weder für Cajalkörperchen noch für Speckles wurden bisher Ko-Lokalisationen mit LBR berichtet. Im Gegensatz zu der punktförmigen Verteilung der Kernkörperchen im Nucleoplasma zeigt LBR in der Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Zellen eine ringförmige Verteilung an der Kernhülle (Lamond und Spector 2003; Hoffmann, Dreger, et al. 2002).

10.4.4 **Interaktion von LBR mit dem „Ubiquitin-conjugating enzyme E2I“ (UBE21)**

Das „**Ubiquitin-conjugating enzyme E2I**“ (**UBE21**) wurde durch den *YTH*-Ansatz als Interaktionspartner für den N-terminalen Bereich von LBR gefunden und durch einen GST-vermittelten Interaktionstest bestätigt. Bei UBE21 handelt es sich um ein Enzym, welches die Bindung des Ubiquitin ähnlichen Proteins „*small ubiquitin-related modifier*“ (SUMO) an Lysin-Reste katalysiert. Der posttranslationalen Sumoylierung von Proteinen kommen verschiedene Funktionen zu. So wirkt sie regulierend auf Protein-Protein Interaktionen, die enzymatische Aktivität, die Stabilität und die innerzelluläre Lokalisation von Proteinen wie beim Übergang vom Zytoplasma in den Kern. Proteine, die als Kandidaten für die Sumoylierung durch UBE21 in Frage kommen, besitzen ein charakteristisches Sumoylierungsmotiv ψ KxE/D (Guo, Yang et

al. 2007; Meulmeester, Melchior et al. 2008). In der AS-Sequenz von LBR konnten wir dieses Motiv jedoch nicht finden. Dennoch ist es denkbar, dass *in vivo* durch geeignete Proteinfaltung ein Sumoylierungsmotiv entstehen kann. Das um wenige kDa schwerere sumoylierte LBR sollte in der immunbiochemischen Analyse aus Zellextrakten durch einen für SUMO spezifischen Antikörper nachgewiesen werden können. Unsere ersten Untersuchungen zum Nachweis von sumoyliertem LBR aus Zellextrakten erbrachten keinen Hinweis auf eine Sumoylierung von LBR (die Daten werden hier nicht gezeigt).

10.5 Interaktionspartner für LBR und Lamin A aus der zerebralen cDNA-Bibliothek

10.5.1 Interaktionspartner für LBR mit „Fetal Alz50-reactive clone-1“ (FAC1)

Aus einer konstitutiv aus zerebralen Faktoren zusammengesetzten cDNA-Bibliothek konnte das „**Fetal Alz50-reactive clone-1**“ (**FAC1**), das in der Literatur gelegentlich auch als „**FALZ**“ bezeichnet wird, als einziger Interaktionspartner für LBR identifiziert werden. In diesem YTH-Ansatz interagierten die beiden Konstrukte LBR (AS 431-493) sowie LBR (AS 577-615). Bei der Überprüfung im GST-vermittelten Interaktionstest konnten wir die Wechselwirkung für den LBR N-Terminus (AS 61-207) und zusätzlich für den Bereich im LBR-C-Terminus (AS 577-615) bestätigen. Zugleich grenzte das im YTH-Ansatz gefundene Konstrukt FAC1 (AS 1-202) die Interaktionsdomäne auf den N-Terminus des insgesamt 2764 AS großen FAC1 Proteins ein. Möglicherweise spielt dabei die Proteinfaltung, die sich in Hefe anders gestalten kann als unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus, eine Rolle für die Interaktionsfähigkeit. Die Literaturrecherche ergab, dass es sich bei FAC1 um einen Regulator der Transkription handelt, mit erhöhter Expression sowohl während der Entwicklung als auch während der Degeneration von Neuronen (Jordan-Sciutto, Dragich, 1999a; Styren, Bowser et al. 1997; Mu, Springer et al. 1997; Schoonover, Davies et al. 1996). Während im fötalen Cortex eine starke Expression sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleoplasma gefunden werden kann, lokalisiert FAC1 im adulten Organismus fast ausschließlich in den Kernen der Neuronen des Neocortex (Zhu und Bowser, 1996). Die Bindung an DNA wird durch eine DNA-bindende Domäne vermittelt, wodurch deren Transkription unterdrückt wird (Jordan-Sciutto, Dragich 1999a; Jordan-Sciutto, Dragich 1999b).

Bezüglich der Interaktionspartner ergab die Recherche, dass FAC1 mit dem humanen orthologen Protein für das Kelch-like ECH-assoziierte Protein (Keap1) der Maus interagiert (Strachan, Morgan et al. 2004). Keap1 bewirkt die Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 als Antwort auf oxidativen Stress aus dem Zytoplasma in den Kern (Itoh, Wakabayashi et al. 1999). FAC1 kolokalisiert mit Keap1 im Zytoplasma. Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Keap1 auch mit Actin im Zytoplasma interagiert (T'Jampens, Devriendt et al. 2002; Kang, Kobayashi et al. 2004; Strachan, Morgan et al. 2004). Dabei wird die Interaktion sowohl für Actin als auch für FAC1 über die Kelch-Domäne vermittelt. Bei erhöhter Expression von Keap1 wird eine Umverteilung von FAC1 im Zytoplasma an die Kernperipherie hervorgerufen (Strachan, Morgan et al. 2004). Da FAC1 in adulten Organismen im Kern lokalisiert wird angenommen, dass Keap1 für eine Translokation von FAC1 ins Zytoplasma verantwortlich ist. Somit wäre denkbar, dass die Bindung von FAC1 an LBR bei der Retention von FAC1 im Kern eine Rolle spielt. Bezogen auf die Differenzierung von Granulozyten könnte hier ein Anstieg für LBR für eine Anreicherung von FAC1 sorgen und dadurch Einfluss auf die Regulation der Transkription ausüben. FAC1 ist demnach ein potentieller Interaktionspartner für LBR, der durch seine DNA-bindende Domäne an der Umorganisation von Chromatin und der Repression von Transkription beteiligt sein könnte. Ein möglicher Ansatz, diesen Zusammenhang *in vivo* zu verifizieren, wäre die Lokalisation von endogenem oder transfiziertem FAC1 im Zellkern während der Differenzierung der HL-60/S4 Zellen zu verfolgen. Möglicherweise bildet jedoch das zytoplasmatische FAC1 ein direktes Bindeglied zwischen Actin und einer Teilfraktion von LBR in der Kernhülle. FAC1 ist auch unter dem Namen *bromodomain and PHD domain transcription factor* (BPTF) als Transkriptionsfaktor bekannt. Das FAC1-Gen gilt als orthologes Gen für das Drosophila Gen *NURF301* (Xiao, Sandaltzopoulos et al. 2001). Nurf301 spielt eine Rolle beim Umbau der Nukleosomen durch den Austausch von Histonen (Jones, Hamana et al. 2000). Es wäre denkbar, dass durch LBR FAC1 während der Differenzierung von Granulozyten an der Kernperipherie angereichert wird, und hier am Umbau von Nucleosomen beteiligt ist.

10.5.2 **Interaktion von Lamin A und dem „Retinoblastom binding Protein4“ (RBBP4)**

Das „*Retinoblastom binding protein 4*“ (RBBP4) interagiert im YTH-Ansatz nur mit dem C-terminalen Lamin A-Fragment (AS 562-664) und mit keinem der N-terminalen Fragmente. Somit scheint die C-terminale Domäne von Lamin A entscheidend zu sein für diese Interaktion. Wir konnten diese Wechselwirkung unter physiologischen Bedingungen mittels des GST-vermittelten Interaktionstests bestätigen. In weiterführenden Studien in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Misteli konnte die Interaktion durch Koimmunpräzipitation aus U2OS Zellen mit ektopisch exprimiertem Lamin A für RBBP4 und RBBP7 *in vivo* bestätigt werden (Pegoraro, Kubben et al. 2009). Die Recherche ergab, dass es sich bei RBBP4 und RBBP7 um zu 89% homologe, evolutionär hochkonservierte und Heterochromatin bindende Proteine handelt (Verreault, Kaufman et al. 1998; Qian, Wang et al. 1993). Sie sind Teil von mehreren Heterochromatin-organisierenden Multiproteinkomplexen. Dazu gehören der „*Nucleosome remodelling and deacetylase*“-Komplex (NURD) sowie der „*Polycomb*“-Komplex (PRC2) (Zhang, Ng et al. 1999; Kuzmichev, Nishioka et al. 2002). RBBP4 ist Teil des „*Chromatin assembly factor*“-Komplexes (CAF), der an der Chromatin-Organisation während der DANN-Replikation sowie der DNA-Reparatur beteiligt ist (Verreault, Kaufman et al. 1996). Für die Maus konnte gezeigt werden, dass RBBP4 in unterschiedlichen Mengen in allen Geweben exprimiert wird (Qian, Wang et al. 1993).

10.5.3 **Bedeutung von RBBP4 und RBBP7 bei molekularen Prozessen der Zellalterung**

Im Folgenden wurde der Frage, nachgegangen, inwiefern RBBP4 und RBBP7 an molekularen Prozessen des Alterns und den damit einhergehenden Veränderungen der Chromatin-Organisation beteiligt ist. Als Modellzellen für den Alterungsprozess wurden HGPS-Zellen herangezogen, da diese, wie es auch für den physiologischen Alterungsprozess charakteristisch ist, eine Reihe von Defekten der Chromatinstruktur und eine Anhäufung von DNA-Schäden aufweisen (Shumaker et al., 2006; Scaffidi und Misteli, 2004). Mehrere experimentelle Ansätze zeigten den direkten Einfluss von Progerin auf den RBBP4/7 Gehalt in Zellen. So war der Gehalt an RBBP4 und RBBP7 in Zellen von Patienten mit HGPS im Vergleich zu gleich oft passagierten

Zellen gesunder Spender deutlich reduziert. Der Verlust von RBBP4 und RBBP7 konnte auch durch die Transfektion mit induzierbarem GFP-Progerin ausgelöst werden (Pegoraro, Kubben et al. 2009). Interessanterweise konnte die Reduktion von RBBP4 in HGPS-Zellen nur auf der Proteinebene beobachtet werden, denn die RT-PCR-Analysen zeigen ähnliche mRNA-Mengen wie in Kontroll-Fibroblasten. Als Folge des Verlustes von RBBP4 und RBBP7 konnten in mehreren experimentellen Ansätzen charakteristische Merkmale der Zellalterung beobachtet werden. Die Verminderung der zellulären Konzentration von RBBP4 durch siRNA reichte aus, um mehrere der alterungs-abhängigen phänotypischen Veränderungen von Chromatin auszulösen. Dazu gehören der Verlust von perizentromeren Heterochromatinmarkern wie H3K9me3, der Verlust von HP1, sowie die Aktivierung der Transkription von sogenannten *SatIII repeats*. Als Marker für DNA-Schädigungen wurde die Anwesenheit des Histons H2AX untersucht. Dieses war in den siRNA behandelten Zellen um mehr als 50% erhöht. Die Tatsache, dass nur die simultane Auslöschung von RBBP4 und RBBP7 diesen Effekt hervorruft, nicht jedoch die einzelne Auslöschung, lässt auf eine funktionelle Redundanz von RBBP4 und RBBP7 schließen (Pegoraro, Kubben et al. 2009). Die Stilllegung der Genexpression von RBBP4 und RBBP7 mittels siRNA führte zu einem Verlust von Centromer-Protein-A (CENP-A) (Hayashi, Fujita et al., 2004). Aus der deutlichen Reduktion von HP1 und CENP-A lassen sich weitgreifende Chromatindefekte ableiten, die sich mit zunehmender Passagierung der Zellen verstärkten (Scaffidi and Misteli 2006; Shumaker, Dechat et al. 2006).

10.5.4 Bedeutung des NURD-Komplexes für molekulare Prozesse der Zellalterung

Durch Progerin gehen in HGPS-Zellen neben RBBP4 weitere Komponenten des NURD-Komplexes verloren, Bestandteile des PRC2-Komplexes bzw. des CAF-1 - Komplexes hingegen fehlen nicht. Die Reduktion der Expression jeder einzelnen Komponente des NURD-Komplexes, HDAC1, MTA3, CHD3 und CHD4, mittels siRNA in HeLa Zellen führt, ähnlich wie für RBBP4 und 7 allein, zu einem Verlust der Methylierung des Lysin 9 (H3K9me3) des Histons H3, zur Anreicherung von HP1 γ -Heterochromatin sowie zu alterungstypischen DNA-Schädigungen. Auch in physiologisch gealterten Zellen kann im Vergleich zu physiologisch jungen Zellen ein

deutlicher Verlust der NURD-Komplex-Proteine gefunden werden. Somit kann gezeigt werden, dass die Wechselwirkung von Lamin A mit Proteinen des NURD-Komplexes und speziell mit RBBP4 und 7 eine wichtige Rolle für den vorzeitigen sowie den physiologischen Zellalterungsprozess darstellt. Somit kann in diesem Punkt eine Übereinstimmung des HGPS-Modells mit der physiologischen Alterung festgestellt werden (Pegoraro, Kubben et al. 2009).

10.5.5 Verknüpfung des Lamin A-Interaktoms mit dem BAF-Interaktom durch RBBP4

Innerhalb eines Untersuchungsansatzes, der die Kernhüllenproteine zum Gegenstand hatte, konnten unter etwa 70 Proteinen auch RBBP4, RBBP7 und Lamin A als Interaktionspartner für den „Barrier to autointegration factor“ (BAF) identifiziert und durch Ko-Immunopräzipitation aus transient transfizierten Zellen verifiziert werden (Montes de Oca, Shomaker et al. 2009). BAF bindet direkt an Lamine (Margalit, Brachner et al. 2007). Es bindet direkt an doppelsträngige DNA (Lee, Craigie et al. 1998) sowie an eine Reihe von Transmembranproteinen mit LEM-Domäne die in die inneren Kernmembran eingelagert sind (Wagner, Krohne et al. 2007). Es spielt eine wichtige Rolle für die Integrität des Lamin-Netzwerkes an der Kernhülle (Wagner, Krohne 2007). Darüber hinaus nimmt BAF Einfluss auf eine Vielzahl von Prozessen, darunter die Mitose, die Ausbildung der Chromatinstruktur und die Genexpression (Wang, Xu et al. 2002). Diese Untersuchungen sind ein weiterer Beleg dafür, dass Proteine der Kernlamina und deren assoziierte Proteine durch eine Vielzahl von Interaktionen zu einem „Interaktom“ vernetzt sind, das eng mit den Prozessen des Kerns wie der Chromatinorganisation und der Genexpression verknüpft ist (Montes de Oca, Shomaker et al. 2009).

10.5.6 Interaktion des „Cockayne syndrome Type A“ (CSA) Proteins mit Lamin A

„Cockayne syndrome Type A“ (CSA), auch bekannt als **CKN1**, wurde in der aus zerebralen Faktoren zusammengesetzten cDNA Bibliothek im *YTH-Ansatz* als Interaktionspartner für den C-terminalen Bereich von Lamin A (AS 562-664) identifiziert. Da CKN1 mit keinem der N-terminalen Konstrukte für Lamin A interagiert, scheint die C-terminale Domäne von Lamin A entscheidend für diese Interaktion zu sein. Das isolierte CKN1 cDNA-Konstrukt repräsentiert CKN1 in voller

Länge. Diese Interaktion konnten wir auch unter physiologischen Bedingungen im GST-vermittelten Interaktionstest bestätigen. Zur weiteren Bestätigung der Interaktion *in vivo* könnte neben Ko-Lokalisationsuntersuchungen eine Ko-Immunpräzipitation aus Zellen durchgeführt werden. Über CKN1 ist bekannt, dass Mutationen im CKN1 Gen zu einer Erbkrankheit führen, die als Cockaine Syndrom (CS) Type A beschrieben wird (Henning, Li et al. 1995). Das Cockaine Syndrom Typ A zeigt durch seinen progeroiden Phänotyp auffällige Gemeinsamkeiten mit dem Hutchison-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS). Wie im Review von Nance und Berry (1992) zusammenfassend beschrieben wird, erreichten die meisten der untersuchten Patienten mit CS Typ A lediglich ein Alter von etwa 12,5 Jahren. Sie zeigen bereits in den ersten Lebensjahren ein abnormales, verlangsamtes Wachstum. Die Haut der Patienten zeigt eine verstärkte Photosensitivität. Das auffällige äußere Erscheinungsbild wird von einer verlangsamten neuralen Entwicklung, sowie von schweren, progressiven neurologischen Degenerationen begleitet (Nance und Berry 1992). Eine häufige Ursache für progeroide Erkrankungen sind genetische Defekte im DNA-Reparatursystem. Hieraus wurde geschlossen, dass Schädigungen der DNA durch Oxidantien oder UV-Licht eine entscheidende Rolle beim Alterungsprozess spielen (Kamenisch und Berneburg 2009). Genauso ist das CKN1-Protein, das auch unter den Namen ERCC8 bekannt ist, als Teil des „*Nucleotid Excision Repair* (NER)“-Systems an der Behebung eines breiten Spektrums von DNA-Schädigungen beteiligt (Troelstra, van Gool et al. 1992). CKN1 spielt des weiteren eine Rolle bei der Transkription. So verursacht das CKN1-Protein von CS-Patienten einen Defekt bei der Polymerase II-abhängigen Transkription (Bregman, Halaban et al. 1996). Als weiterer Interaktionspartner für CKN1 wird das *DNA damage-binding protein 1* (DDB1) beschrieben (Groisman, Polanowska et al. 2003). Dass beide Erkrankungen, sowohl HGPS als auch CS, ein progeroides Erscheinungsbild zeigen, lässt einen engen funktionellen Zusammenhang zwischen Lamin A und CKN1 naheliegend erscheinen. Weitere Untersuchungen könnten dahingehen, zum einen das Verteilungsmuster von Lamin A in Zellen von CS Typ A -Patienten nach Auffälligkeiten zu untersuchen. Zum anderen könnte der Einfluss von Progerin auf die Verteilung und Wirkungsweise von CKN1 in Zellen untersucht werden. So könnte der Einfluss von Progerin auf die Funktion der mit CKN1 verbundenen DNA

Reparatursysteme, insbesondere unter oxidativem Stress oder der Einwirkung von UV-Licht, untersucht werden.

10.5.7 Interaktion von „Pleiotrophin“ (PTN1) mit Lamin A

„Pleiotrophin“ (PTN1) wurde aus der konstitutiv aus zerebralen Faktoren zusammengesetzten cDNA-Bibliothek als Interaktionspartner für den Lamin C-Terminus von Lamin A (AS 562-664) identifiziert. Im GST-vermittelte Interaktionstest zeigten wir eine starke Interaktion unter physiologischen Bedingungen. Wir gehen davon aus, dass die C-terminale Domäne von Lamin A für die Interaktion entscheidend ist, da keines der anderen im YTH-Ansatz eingesetzten Lamin A-Konstrukte mit PTN1 interagiert. Für PTN1 wurde dabei ein cDNA-Konstrukt mit der gesamten Länge des PTN1 eingesetzt. Erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit ektopisch exprimiertem GFP-PTN1 in U20S-Zellen bestätigten die Lokalisation des Proteins im Kern, vor allem innerhalb der Nucleoli (Daten werden hier nicht gezeigt). Die Recherche zu PTN1 ergab, dass der Name Pleiotrophin 1 zum Ausdruck bringt, dass PTN1 mehrere Funktionen zugeordnet werden können. PTN1 wurde erstmals von Li et al. (1990) isoliert und zum einen unter seiner Funktion als „*Neurite growth-promoting factor 1*“ (NEGF1), zum anderen als „*Heparin-binding growth factor 8*“ (HBGF8) beschrieben (Li, Milner et al. 1990). Seine Fähigkeit, die Ausbildung von Axonen zu fördern, weist darauf hin, dass PTN1 eine Rolle bei der Bildung und Erhaltung von Nervengewebe spielt. Die Expression dieses Faktors wird entwicklungsabhängig reguliert und er wird während der Embryogenese kurz vor der Geburt maximal exprimiert (Eddy, Kretschmer et al., 1991). Aufgrund seiner erhöhten Expression bei gastrointestinalen Krebserkrankungen, wie sie für Pankreaskrebs beschrieben wird, wird angenommen, dass PTN1 einen essentiellen Wachstumsfaktor im Rahmen der Entwicklung von Pankreaskrebs darstellt (Soultou, Juhl et al. 1998; Weber, Klomp et al. 2000). Wachstumsfaktoren binden im allgemeinen an extrazelluläre Rezeptoren und aktivieren dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade, durch welche die Proliferation der Zellen angeregt wird. Eine Lokalisation im Zellinneren bzw. im Kern ist daher eher ungewöhnlich. Die von uns gezeigte Bindung von PTN1 an Lamin A weist jedoch stark darauf hin, dass PTN1 neben seiner Funktion als extrazellulärer Wachstumsfaktor eine weitere Funktion im Zellinneren besitzen könnte. Ein Beispiel

für ein Protein mit einer Doppelfunktion als Wachstumsfaktor und Transkriptionsfaktor ist der „*Lense epithelium growth factor*“ (LEDGF), der auch als Transkriptions Koaktivator p75 beschrieben wird (Singh, Ohguro et al. 1999; Ge, Si et al. 1998).

10.5.8 Interaktion des „*Tubulin alpha 3*“ (TUBA3) mit Lamin A

Mit „*Tubulin alpha 3*“ (TUBA3) konnten wir einen weiteren Interaktionspartner überprüfen, der aus dem *YTH*-Ansatz aus einer konstitutiv aus zerebralen Faktoren zusammengesetzten cDNA-Bibliothek durchgeführt wurde. Die Interaktion mit der C-terminalen Lamin A (AS 562-664) Domäne ist entscheidend für die Interaktion, da der Klon für TUBA3 die cDNA für das Protein in voller Länge repräsentiert und da dieser auch mit keinem der übrigen Lamin A-Konstrukte interagiert. Auch die Überprüfung mittels des GST-vermittelten Interaktionstests bestätigte eine starke Bindung beider Proteine. TUBA3 wird meist unter dem Namen TUBA1A publiziert. Es gehört zur Genfamilie der α -Tubuline, die beim Menschen aus acht α -Tubulin- und sieben β -Tubulin-Genen besteht (Poirier, Keays et al. 2007; Verdier-Pinard, Pasquier et al. 2009). Die verschiedenen Isoformen der Tubuline bilden die Hauptkomponenten der Mikrotubuli. Mikrotubuli übernehmen wichtige Funktionen während der Mitose, der Zellwanderung und bei intrazellulären Transportprozessen (Beaudouin, Gerlich et al. 2002). Die verschiedenen Isoformen der Tubuline werden zelltypspezifisch exprimiert. Die β - α -1 mRNA wird ausschließlich im Gehirn exprimiert (Cowan, Dobner et al. 1983). Eine besonders hohe Expression des TUBA1A Gens wurde im Gehirn humaner Föten entdeckt (Poirier, Keays et al. 2007). Bei einer Vielzahl von Patienten mit Lysencephalie, die sich unter anderem durch Microcephalie und einer Fehlbildung der Gyri und Sulci darstellt, kann die Ursache der Erkrankung auf verschiedenste Mutationen im TUBA1A Gen zurückgeführt werden (Keays, Tian et al. 2007; Poirier, Keays et al. 2007). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass pathogene Mutationen für TUBA1A die Funktion der Mikrotubuli beeinträchtigen und dadurch die Wanderungsfähigkeit der Neuronen beeinflussen (Keays, Tian et al. 2007). Da es sich bei den Tubulinen um zytoplasmatische Proteine handelt (Steger, Schimmel et al. 1994), wäre eine Interaktion zwischen Lamin A und TUBA3 nach der Öffnung der Kernhülle während der Mitose denkbar.

10.5.9 Interaktion des „Tumor suppressor candidate“ (TUSC4) mit Lamin A

Der „Tumor suppressor candidate“ (TUSC4) konnte als ein weiterer Faktor aus dem YTH-Ansatz identifiziert werden. Da der cDNA-Klon für TUSC4, der uns in gesamter Länge vorlag ausschließlich mit dem Lamin A- Fragment (AS 562-664), nicht aber mit den N-terminalen Fragmenten interagierte, betrachten wir die C-terminale Domäne als entscheidend für die Interaktion mit TUSC4. Im GST-vermittelten Interaktionstest konnte die Bindung der Proteine bestätigt werden. Es wird beschrieben, dass TUSC4 neben einer Granulin-Protein-bindenden Domäne ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal besitzt, was seine Lokalisation im Kern und damit die Interaktion mit Lamin A im Kern ermöglichen würde (Lerman und Minna, 2000). Es wird aufgrund seiner Lokalisation auf 3p21.3C, der sogenannten „Lungen-Krebs-Region“, als Tumorsuppressor-Gen eingestuft (Li, Wang et al. 2004). Die stärkste Expression von TUSC4 wird in der Skelettmuskulatur, im Gehirn, in der Leber sowie in der Bauchspeicheldrüse gefunden (Lerman und Minna, 2000). TUSC4 bildet einen Komplex mit der *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK1), die ein Schlüsselement bei wichtigen Signaltransduktionswegen darstellt. TUSC4 inhibiert die Tyrosin Phosphorylierung von PDK1 und beeinflusst damit die nachfolgende Signaltransduktion (Kurata, Katayama et al. 2008).

10.6 Zusammenschau zur Bedeutung der gefundenen Interaktionen im Kontext des Lamin A-Interaktoms

Die Lamine und alle Proteine, die diesen in einer funktionellen Interaktion direkt oder indirekt zugeordnet werden können, werden als Lamin-Interaktom zusammengefasst. Durch die Anwendung mehrerer Proteom-basierter Untersuchungsmethoden vergrößerte sich das Lamin-Interaktom kürzlich um mehr als 30 direkte und mehr als 100 indirekte Interaktionspartner (Kubben, Voncken et al. 2010; Prasad, Kandasamy, 2009). Auch die Liste von mehr als 35 in dieser Arbeit gezeigten Interaktionspartner von denen 14 näher charakterisiert wurden, zeigt die Bedeutung der Lamina als Plattform für essentielle Interaktionen. Die Mutationen in den Kernhüllenproteinen Lamin A und LBR führen zu verschiedenen Erbkrankheiten mit gewebespezifischer Auswirkung (Worman und Bonne, 2007). Ein möglicher Ansatz um die Gewebespezifität der Auswirkungen der Erbkrankheiten zu erklären liegt darin, von

einer Zelltyp- bzw. Gewebetyp-spezifischen Zusammensetzung von Proteinkomplexen an der Kernhülle auszugehen (Schirmer, Gerace et al. 2005). Eine Studie, in der das Interaktom der Kernhülle für verschiedene Gewebetypen analysiert wurde, zeigt große Unterschiede in der Zusammensetzung des Kernhüllen-Interaktoms (Korfali, Fairley et al. 2009). Durch diese Unterschiede des Interaktoms der Kernhülle ergeben sich neue Bindungsmöglichkeiten und damit neue funktionelle Zusammenhänge für Lamin A, wodurch das Modell der gewebespezifisch variablen Funktion von Lamin A unterstützt wird (Dittmer, Misteli et al. 2011). Mit RBBP4 haben wir einen Faktor gefunden, der die Bedeutung der Interaktion des NURD-Proteinkomplexes mit Lamin A *in vivo* und *in vitro* verdeutlicht. Die Gegenwart von Prelamin führt zu einer Verringerung von RBBP4 im Zellkern. In Folge nehmen oxidative Schäden an Chromatin zu, wie es für den Prozess der physiologischen Alterung charakteristisch ist (Pegoraro, Kubben et al., 2009). Die Lamine gelten als globale Organisatoren von Chromatin. Transkriptionell inaktive Regionen werden bevorzugt an der Kernlamina gefunden (Fawcett et al. 1966; Belmont, Zhai et al. 1995). Durch die Genom-weite Kartierungstechnik „DamID“ konnten die Kontakte zwischen dem Genom und der Kernhülle als Lamina assoziierte Regionen (LADs) identifiziert werden (Guelen, Pagie et al. 2008). Die Gendichte in den LADs ist relativ niedrig, wenngleich immer noch mehrere tausend Gene darin enthalten sein können (Bolzer, Kreth et al. 2005; Guelen, Pagie et al. 2008). LAD assoziierte Gene sind transkriptionell inaktiv (Lanctot, Cheutin et al. 2007). Die gewebespezifische Wirksamkeit der Lamin A-Mutationen liesse sich möglicherweise auch darauf zurückführen, dass eine differenzierungsabhängige Komposition der Lamine sowie der Lamin-Proteinkomplexe unterschiedliche Chromatin-Bereiche an die Kernhülle rekrutiert und transkriptionell stilllegt. Somit kann die Bereitstellung eines funktionellen Protein-Netzwerks um Lamin A dabei helfen, die Differenzierungs- und gewebs-spezifischen Proteinkomplexe an der Kernlamina zu identifizieren.

11 Literatur

- Aebi, U., J. Cohn, et al. (1986). "The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments." Nature 323(6088): 560-4.
- Bainton, D. F., J. L. Ulliot, et al. (1971). "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow." J Exp Med 134(4): 907-34.
- Beaudouin, J., D. Gerlich, et al. (2002). "Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina." Cell 108(1): 83-96.
- Belmont, A. S., Y. Zhai, et al. (1993). "Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography." J Cell Biol 123: 1671-1685.
- Bennati, A. M., G. Schiavoni, et al. (2008). "Disruption of the gene encoding 3beta-hydroxysterol Delta-reductase (Tm7sf2) in mice does not impair cholesterol biosynthesis." FEBS J 275(20): 5034-47.
- Bennett, M. and R. Reed (1993). "Correspondence between a mammalian spliceosome component and an essential yeast splicing factor." Science 262(5130): 105-8.
- Bolzer, A. G. Kreth (2005). "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes." PLoS biology 3:e157.
- Bowles, C. A., R. D. Alsaker, et al. (1979). "Studies of the Pelger-Huet anomaly in foxhounds." Am J Pathol 96(1): 237-48.
- Bowser, R., A. Giambrone, et al. (1995). "FAC1, a novel gene identified with the monoclonal antibody Alz50, is developmentally regulated in human brain." Dev Neurosci 17(1): 20-37.
- Bregman, D. B., R. Halaban, et al. (1996). "UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells." Proc Natl Acad Sci U S A 93(21): 11586-90.
- Broers, J. L., F. C. Ramaekers, et al. (2006). "Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing." Physiol Rev 86(3): 967-1008.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol 25(2): 169-93.
- Calzado, M. A., F. Renner, et al. (2007). "HIPK2: a versatile switchboard regulating the transcription machinery and cell death." Cell Cycle 6(2): 139-43.
- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, et al. (1979). "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease." Biochemistry 18(24): 5294-9.
- Chkheidze, A. N. and S. A. Liehaber (2003). "A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the alphaCP RNA-binding proteins." Mol Cell Biol 23(23): 8405-15.

- Cohen, M., K. K. Lee, et al. (2001). "Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina." Trends Biochem Sci 26(1): 41-7.
- Corrigan, D. P., D. Kuszczak, et al. (2005). "Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24." Biochem J 387(Pt 1): 129-38.
- Courvalin, J. C., N. Segil, et al. (1992). "The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase." J Biol Chem 267(27): 19035-8.
- Cowan, N. J., P. R. Dobner, et al. (1983). "Expression of human alpha-tubulin genes: interspecies conservation of 3' untranslated regions." Mol Cell Biol 3(10): 1738-45.
- Crisp, M., Q. Liu, et al. (2006). "Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex." J Cell Biol 172(1): 41-53.
- Dahl, K. N., A. J. Ribeiro, et al. (2008). "Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction." Circ Res 102(11): 1307-18.
- De Sandre-Giovannoli, A., R. Bernard, et al. (2003). "Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria." Science 300(5628): 2055.
- Dechat, T., T. Shimi, et al. (2007). "Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging." Proc Natl Acad Sci U S A 104(12): 4955-60.
- Dhe-Paganon, S., E. D. Werner, et al. (2002). "Structure of the globular tail of nuclear lamin." J Biol Chem 277(20): 17381-4.
- Dinant, C. and M. S. Luijsterburg (2009). "The emerging role of HP1 in the DNA damage response." Mol Cell Biol 29(24): 6335-40.
- Eddy, R. L., P. J. Kretschmer et al. (1991). "A human gene family of neurite outgrowth-promoting proteins: the gene for a heparin binding neurite outgrowth-promoting factor maps to 7q22-qter." Cell Genet 58: 1920-only.
- Ellenberg, J., E. D. Siggia, et al. (1997). "Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis." J Cell Biol 138(6): 1193-206.
- Eriksson, M., W. T. Brown, et al. (2003). "Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Nature 423(6937): 293-8.
- Franke, W. W. (1988). "Matthias Jacob Schleiden and the definition of the cell nucleus." Eur J Cell Biol 47(2): 145-56.
- Fawcett, D. W., (1966). "On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates." Am J Anat 119: 129-145.
- Ge, H., Y. Si, et al. (1998). "Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation." EMBO J 17(22): 6723-9.
- Goldberg, M., A. Harel, et al. (1999). "The nuclear lamina: molecular organization and interaction with chromatin." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 9(3-4): 285-93.

- Goller, T., F. Vauti, et al. (2008). "Transcriptional regulator BPTF/FAC1 is essential for trophoblast differentiation during early mouse development." Mol Cell Biol 28(22): 6819-27.
- Gotzmann, J. and R. Foissner (1999). "Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 9(3-4): 257-65.
- Green, M. C., L. D. Shultz, et al. (1975). "Abnormal nuclear morphology of leukocytes in the mouse mutant ichthyosis." Transplantation 20(2): 172-5.
- Gresko, E., A. Moller, et al. (2005). "Covalent modification of human homeodomain interacting protein kinase 2 by SUMO-1 at lysine 25 affects its stability." Biochem Biophys Res Commun 329(4): 1293-9.
- Grewal, S. I. and S. C. Elgin (2002). "Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure." Curr Opin Genet Dev 12(2): 178-87.
- Grimes, B. R., J. Babcock, et al. (2004). "Assembly and characterization of heterochromatin and euchromatin on human artificial chromosomes." Genome Biol 5(11): R89.
- Groisman, R., J. Polanowska, et al. (2003). "The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage." Cell 113(3): 357-67.
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, et al. (2005). "The nuclear lamina comes of age." Nat Rev Mol Cell Biol 6(1): 21-31.
- Guo, B., S. H. Yang, et al. (2007). "Signalling pathways and the regulation of SUMO modification." Biochem Soc Trans 35(Pt 6): 1414-8.
- Guelen, L., L. Pagie (2008). "Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions." Nature 453:948-951.
- Goldman, R. D., (2004). "Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Hill progeria syndrome." Proc Natl Acad Sci USA 101,8963-8968.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol 166(4): 557-80.
- Hayashi T., Y. Fujita (2004). "Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres." Cell 118(6):715-29.
- Heald, R. and F. McKeon (1990). "Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis." Cell 61(4): 579-89.
- Henning, K. A., L. Li, et al. (1995). "The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH." Cell 82(4): 555-64.
- Herrmann, H., H. Bar, et al. (2007). "Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics." Nat Rev Mol Cell Biol 8(7): 562-73.
- Herrmann, H. and R. Foissner (2003). "Intermediate filaments: novel assembly models and exciting new functions for nuclear lamins." Cell Mol Life Sci 60(8): 1607-12.

- Hoffmann, K., C. K. Dreger, et al. (2002). "Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly)." Nat Genet 31(4): 410-4.
- Hoffmann, K., K. Sperling, et al. (2007). "The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid." Chromosoma 116(3): 227-35.
- Hofmann, T. G., A. Moller, et al. (2002). "Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2." Nat Cell Biol 4(1): 1-10.
- Holmer, L. and H. J. Worman (2001). "Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting." Cell Mol Life Sci 58(12-13): 1741-7.
- Hutchison, C. J., M. Alvares-Reyes (2001). "Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue specific disease phenotypes?" J Cell Sci 114,9-19.
- Itoh, K., N. Wakabayashi (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant-responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." Genes Dev 13,76-86.
- James, T. C., S. C. Elgin, (1986). "Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene." Mol Cell Biol 6, 3862-3872
- Jones, M. H., N. Hamana, et al. (2000). "Identification and characterization of BPTF, a novel bromodomain transcription factor." Genomics 63(1): 35-9.
- Jordan-Sciutto, K. L., J. M. Dragich, et al. (1999a). "DNA binding activity of the fetal Alz-50 clone 1 (FAC1) protein is enhanced by phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun 260(3): 785-9.
- Jordan-Sciutto, K. L., J. M. Dragich, et al. (1999b). "Fetal Alsz-50 clone1, a novel zinc finger protein, binds a specific DNA sequence and acts as a transcriptional regulator." J. Biol. Chem. 274,3526235268.
- Kamenisch, Y. and M. Berneburg (2009). "Progeroid syndromes and UV-induced oxidative DNA damage." J Investig Dermatol Symp Proc 14(1): 8-14.
- Kapinos, L. E., J. Schumacher, et al. "Characterization of the head-to-tail overlap complexes formed by human lamin A, B1 and B2 "half-minilamin" dimers." J Mol Biol 396(3): 719-31.
- Karabinos, A., J. Schunemann, et al. (2003). "The single nuclear lamin of *Caenorhabditis elegans* forms in vitro stable intermediate filaments and paracrystals with a reduced axial periodicity." J Mol Biol 325(2): 241-7.
- Keays, D. A., G. Tian, et al. (2007). "Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans." Cell 128(1): 45-57.
- Kielkopf, C. L., Rodionova, N. A. et al., (2001). "A novel peptide recognition mode revealed by the X-ray structure of a core U2AF35/U2AF65 heterodimer." Cell 106: 595-605.
- Kim, Y. H., C. Y. Choi, et al. (1999). "Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1." Proc Natl Acad Sci U S A 96(22): 12350-5.

- Kim, Y. H., C. Y. Choi, et al. (1998). "Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors." J Biol Chem 273(40): 25875-9.
- Kiss, M. and G. Komar, Jr. (1967). "[Pelger-Huet nuclear anomaly in leukocytes in a dog]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr 80(24): 474-6.
- Kouklis, P. D., A. Merdes, et al. (1993). "Transient arrest of 3T3 cells in mitosis and inhibition of nuclear lamin reassembly around chromatin induced by anti-vimentin antibodies." Eur J Cell Biol 62(2): 224-36.
- Korfali, N., E. A. Fairley, et al. (2009). "Use of sequential chemical extractions to purify nuclear membrane proteins for proteomics identification." Methods Mol Biol 528:201-25.
- Krimm, I., C. Ostlund, et al. (2002). "The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy." Structure 10(6): 811-23.
- Krohne, G., I. Waizenegger, et al. (1989). "The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope." J Cell Biol 109(5): 2003-11.
- Kubben, N., J. W. Voncken, et al. (2010). "Mapping of protein- and chromatin-interactions at the nuclear lamina." Nucleus 1: 460-471.
- Kurata, A., R. Katayama, et al. (2008). "TUSC4/NPRL2, a novel PDK1-interacting protein, inhibits PDK1 tyrosine phosphorylation and its downstream signaling." Cancer Sci 99(9): 1827-34.
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, et al. (2002). "Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein." Genes Dev 16(22): 2893-905.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-5.
- Lanctot, C., T. Cheutin (1907). "Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions." Nature Rev 8:104-115.
- Lamond, A. I. and J. E. Sleeman (2003). "Nuclear substructure and dynamics." Curr Biol 13(21): R825-8.
- Lamond, A. I. and D. L. Spector (2003). "Nuclear speckles: a model for nuclear organelles." Nat Rev Mol Cell Biol 4(8): 605-12.
- Latimer, K. S., P. M. Rakich, et al. (1985). "Pelger-Huet anomaly in cats." Vet Pathol 22(4): 370-4.
- Leffers, H., K. Dejgaard, et al. (1995). "Characterisation of two major cellular poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains." Eur J Biochem 230(2): 447-53.
- Lerman, M. I. and J. D. Minna (2000). "The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium." Cancer Res 60(21): 6116-33.

- Li, J., F. Wang, et al. (2004). "Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C." Cancer Res 64(18): 6438-43.
- Li, Y. S., P. G. Milner, et al. (1990). "Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity." Science 250(4988): 1690-4.
- Loewinger, L. and F. McKeon (1988). "Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm." EMBO J 7(8): 2301-9.
- Lee, M. S., R. Craigie, et al. (1998). "A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration." Proc Natl Acad Sci USA 95: 1528-1533.
- Makatsori, D., N. Kourmouli, et al. (2004). "The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope." J Biol Chem 279(24): 25567-73.
- Martins, S. B., T. Eide, et al. (2000). "HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics." J Cell Sci 113 Pt 21: 3703-13.
- Meng, Q., S. K. Rayala, et al. (2007). "Signaling-dependent and coordinated regulation of transcription, splicing, and translation resides in a single coregulator, PCBP1." Proc Natl Acad Sci U S A 104(14): 5866-71.
- Meyer, W. H. and T. H. Howard (1983). "Changes in actin content during induced myeloid maturation of human promyelocytes." Blood 62(2): 308-14.
- Meulmeester, E. and F. Melchior (2008). "Cell biology: SUMO." Nature 452(7188):709-11.
- Misteli, T., J. F. Cáceres, et al. (1997). "The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells." Nature 387(6632): 523-7.
- Moir, R. D. and T. P. Spann (2001). "The structure and function of nuclear lamins: implications for disease." Cell Mol Life Sci 58(12-13): 1748-57.
- Mu, X., J. E. Springer (1997). "FAC1 expression and localization in motor neurons of developing, adult, an amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." Exp Neurol 146,17-24.x
- Hofmann, T. G. and A. Möller (2002). "Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomaininteracting protein kinase-2." Nat. Cell Biol. 4: 1–10.
- Margalit, A., A. Brachner (2007). "Barrier to-autointegration factor—a BAFfling little protein." Trends Cell Biol 17: 202–208.
- Moller, A., H. Sirma, et al. (2003). "PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains." Cancer Res 63(15): 4310-4.
- Montes de Oca R, Shoemaker CJ, et al. (2009). "Barrier-to-autointegration factor proteome reveals chromatin-regulatory partners." PLoS One. 16;4(9):e7050.
- Nance, M.R., S. A. Berry , et al. (1992). "Cockayne syndrome: review of 140 cases." PLoS One. Jan 1;42(1):68-84.

- Neer, E. J., C. J. Schmidt, et al. (1994). "The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins." Nature 371(6495): 297-300.
- Nigg, E. A. (1992). "Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina." Semin Cell Biol 3(4): 245-53.
- Nikolakaki, E., J. Meier, et al. (1997). "Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2)." J Biol Chem 272(10): 6208-13.
- Olins, A. L., B. Buendia, et al. (1998). "Retinoic acid induction of nuclear envelope limited chromatin sheets in HL-60." Exp Cell Res 246,91-104.
- Olins, A. L., H. Herrmann, et al. (2001). "Nuclear envelope and chromatin compositional differences comparing undifferentiated and retinoic acid- and phorbol ester-treated HL-60 cells." Exp Cell Res 268(2): 115-27.
- Olins, A. L., H. Herrmann, et al. (2000). "Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization." Exp Cell Res 254(1): 130-42.
- Olins, A. L., T. V. Hoang, et al. (2009). "The LINC-less granulocyte nucleus." Eur J Cell Biol 88(4): 203-14.
- Olins, A. L. and D. E. Olins (2004). "Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells." BMC Cell Biol 5: 30.
- Oosterwijk, J. C., S. Mansour, et al. (2003). "Congenital abnormalities reported in Pelger-Huet homozygosity as compared to Greenberg/HEM dysplasia: highly variable expression of allelic phenotypes." J Med Genet 40(12): 937-41.
- Ostlund, C., T. Sullivan, et al. (2006). "Dependence of diffusional mobility of integral inner nuclear membrane proteins on A-type lamins." Biochemistry 45(5): 1374-82.
- Pegoraro, G., N. Kubben, et al. (2009). "Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex." Nat Cell Biol 11(10): 1261-7.
- Peter, M., E. Heitlinger, et al. (1991). "Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase." EMBO J 10(6): 1535-44.
- Peter, M., J. Nakagawa, et al. (1990). "In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase." Cell 61(4): 591-602.
- Poirier, K., D. A. Keays, et al. (2007). "Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A)." Hum Mutat 28(11): 1055-64.
- Powell, L. and B. Burke (1990). "Internuclear exchange of an inner nuclear membrane protein (p55) in heterokaryons: in vivo evidence for the interaction of p55 with the nuclear lamina." J Cell Biol 111(6 Pt 1): 2225-34.
- Prasad, T. S., K. Kandasamy (2009). "Human Protein Reference Database and Human Proteinpedia as discovery tools for systems biology." Methods Mol Biol 577:67-79.
- Qian, Y. W., Y. C. Wang, et al. (1993). "A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast." Nature 364(6438): 648-52.

- Razafsky, D. and D. Hodzic (2009). "Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections." J Cell Biol 186(4): 461-72.
- Reichart, B., R. Klafke, et al. (2004). "Expression and localization of nuclear proteins in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with LMNA R377H mutation." BMC Cell Biol 5: 12.
- Richards, E. J. and S. C. Elgin (2002). "Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects." Cell 108(4): 489-500.
- Rinaldo, C., F. Siepi, et al. (2008). "HIPKs: Jack of all trades in basic nuclear activities." Biochim Biophys Acta 1783(11): 2124-9.
- Roux, K. J., M. L. Crisp, et al. (2009). "Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization." Proc Natl Acad Sci U S A 106(7): 2194-9.
- Rusinol, A. E. and M. S. Sinensky (2006). "Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors." J Cell Sci 119(Pt 16): 3265-72.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Sarria, A. J., J. G. Lieber, et al. (1994). "The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells." J Cell Sci 107 (Pt 6): 1593-607.
- Scaffidi, P. and T. Misteli (2006). "Lamin A-dependent nuclear defects in human aging." Science 312(5776): 1059-63.
- Scaffidi, P. and T. Misteli (2008). "Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing." Nat Cell Biol 10(4): 452-9.
- Schirmer, E. C., L. Florens, et al. (2003). "Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics." Science 301(5638): 1380-2.
- Schirmer, E. C. and R. Foissner (2007). "Proteins that associate with lamins: many faces, many functions." Exp Cell Res 313(10): 2167-79.
- Schoonover, S., P. Davies (1996). "Immunolocalization and redistribution of the FAC1 protein in Alzheimer's disease." J Neuropathol Exp Neurol 55,444-455.
- Schrick, K., U. Mayer, et al. (2000). "FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in Arabidopsis embryogenesis." Genes Dev 14(12): 1471-84.
- Shi, H., K. Z. Bencze, et al. (2008). "A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin." Science 320(5880): 1207-10.
- Shopland, L. S., C. V. Johnson, et al. (2003). "Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods." J Cell Biol 162(6): 981-90.
- Shultz, L. D., B. L. Lyons, et al. (2003). "Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly." Hum Mol Genet 12(1): 61-9.

- Shumaker, D. K., T. Dechat, et al. (2006). "Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging." Proc Natl Acad Sci U S A 103(23): 8703-8.
- Silve, S., P. H. Dupuy, et al. (1998). "Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta 1392(2-3): 233-44.
- Simos, G. and S. D. Georgatos (1994). "The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32." FEBS Lett 346(2-3): 225-8.
- Simos, G., C. Maison, et al. (1996). "Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope." J Biol Chem 271(21): 12617-25.
- Singh, D. P., N. Ohguro, et al. (1999). "Lens epithelium-derived growth factor: increased resistance to thermal and oxidative stresses." Invest Ophthalmol Vis Sci 40(7): 1444-51.
- Soullam, B. and H. J. Worman (1993). "The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal." J Cell Biol 120(5): 1093-100.
- Souttou, B., H. Juhl, et al. (1998). "Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors." J Natl Cancer Inst 90(19): 1468-73.
- Strachan, G. D., K. L. Morgan, et al. (2004). "Fetal Alz-50 clone 1 interacts with the human orthologue of the Kelch-like E2f-associated protein." Biochemistry 43(38):12113-22.
- Starr, D. A. (2009). "A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes." J Cell Sci 122(Pt 5): 577-86.
- Steger, K., M. Schimmel (1994). "Immunocytochemical demonstration of cytoskeletal proteins in seminiferous tubules of adult rams and bulls." Arch Histol Cytol 57(1): 17-28.
- Stewart, C. L., K. J. Roux, et al. (2007). "Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach." Science 318(5855): 1408-12.
- Stierle, V., J. Couprie, et al. (2003). "The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain." Biochemistry 42(17): 4819-28.
- Strachan, G. D., K. L. Morgan, et al. (2004). "Fetal Alz-50 clone 1 interacts with the human orthologue of the Kelch-like E2f-associated protein." Biochemistry 43(38): 12113-22.
- Strelkov, S. V., J. Schumacher, et al. (2004). "Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins." J Mol Biol 343(4): 1067-80.
- Stuurman, N., S. Heins, et al. (1998). "Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions." J Struct Biol 122(1-2): 42-66.
- Styren, S.D., R. Bowser, et al. (1997). "Expression of fetal ALZ-50 reactive clone 1 (FAC1) in dentate gyrus following entorhinal cortex lesion." J Comp Neurol 386,555-561x

- Takano, M., Y. Koyama, et al. (2004). "Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in *Xenopus* egg extracts." J Biol Chem 279(13): 13265-71.
- Takano, M., M. Takeuchi, et al. (2002). "The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region." Eur J Biochem 269(3): 943-53.
- Troelstra, C., A. van Gool, et al. (1992). "ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes." Cell 71(6): 939-53.
- Verreault, A., P. D. Kaufman, et al. (1996). "Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4." Cell 87(1): 95-104.
- Verreault, A., P. D. Kaufman, et al. (1998). "Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase." Curr Biol 8(2): 96-108.
- Verdier-Pinard, P., E. Pasquier, et al. (2009). "Tubulin proteomics: towards breaking the code." Anal Biochem 384(2):197-20
- Wagner, N., B. Kagermeier, et al. (2006). "The *Drosophila melanogaster* LEM-domain protein MAN1." Eur J Cell Biol 85(2): 91-105.
- Weber, D., H. J. Klomp, et al. (2000). "Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth." Cancer Res 60(18): 5284-8.
- Wickert, U., N. Mücke, et al. (2005). "Characterization of the in vitro co-assembly process of the intermediate filament proteins vimentin and desmin: mixed polymers at all stages of assembly." Eur J Cell Biol 84(2-3): 379-91.
- Wilhelmsen, K., S. H. Litjens, et al. (2005). "Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin." J Cell Biol 171(5): 799-810.
- Worman, H. J. and G. Bonne (2007). "'Laminopathies': a wide spectrum of human diseases." Exp Cell Res 313(10): 2121-33.
- Worman, H. J. and J. C. Courvalin (2005). "Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease." Int Rev Cytol 246: 231-79.
- Worman, H. J., C. D. Evans, et al. (1990). "The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains." J Cell Biol 111(4): 1535-42.
- Worman, H. J., J. Yuan, et al. (1988). "A lamin B receptor in the nuclear envelope." Proc Natl Acad Sci U S A 85(22): 8531-4.
- Wagner, N., G. Krohne, et al. (2007). "LEM-Domain proteins: new insights into lamin-interacting proteins." Int Rev Cytol 261:1-46.
- Wang, X., S. Xu, et al. (2002). "Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function." J Biol Chem 277:43288-43300

- Xiao, H., R. Sandaltzopoulos, et al. (2001). "Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions." Mol Cell 8(3): 531-43.
- Ye, Q., R. M. Barton, et al. (1998). "Nuclear lamin-binding proteins." Subcell Biochem 31: 587-610.
- Ye, Q., I. Callebaut, et al. (1997). "Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR." J Biol Chem 272(23): 14983-9.
- Ye, Q. and H. J. Worman (1996). "Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1." J Biol Chem 271(25): 14653-6.
- Zastrow, M. S., S. Vlcek, et al. (2004). "Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues." J Cell Sci 117(Pt 7): 979-87.
- Zhang, D., P. J. Beresford, et al. (2001). "Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis." Proc Natl Acad Sci U S A 98(10): 5746-51.
- Zhang, X., Y. Kluger, et al. (2004). "Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli." J Leukoc Biol 75(2): 358-72.
- Zhang, Y., H.H. Ng (2004). " Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation." Genes Dev. 13(15):1924-35.
- Zhu, P. and R. Bowser (1996). "Identification and analysis of the complete cDNA sequence for the human FAC1 gene." Biochim Biophys Acta 1309(1-2): 5-8.
- Zwergler, M., H. Herrmann, et al. (2008). "Granulocytic nuclear differentiation of lamin B receptor-deficient mouse EPRO cells." Exp Hematol 36(8): 977-87.

12 Anhang

12.1 Sequenzen der aus dem *YTH-high throughput-Ansatz* erhaltenen Klone

1	<p>MPS323g14.p1.abi_1 TUSC4 ok</p> <p>CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGC= GTCCGAGCTTGCCTGCCCCAGCGACACAGGCCTCGAGGCTGTCTCTGACAAGTGTTCACAGGAGGTGGGGACG= CCTCTGCGCGAGGAACAGGAGAGCTACGGGCTTGGGCCCCGTTATTGCCATGGGCAGCGGCTGCCGCATCGAAT= GCATATTCTTCAGCGAGTTCCACCCACGCTGGGACCCAAAGATCACCTATCAGGTCCCTGAAGACTTCATCTC= CCGAGAGCTGTTTTGACACAGTCCAAGTGTACATCATACCAAGCCAGAGCTGCAGAACAAAGCTTATCACTGTC= ACAGCTATGAAAAAGAAGTGTATCGGCTGTCTGTGTGCATCGAACACAAGAAGTACAGCCGCAATGCTCTCC= TCTTCAACCTGGGCTTCGTGTGTGATGCCAGGCCAAGACCTGCGCCCTCGAGCCCATTTGTTAAAAAGCTGGC= TGGCTATCTGACCACACTAGAGCTAGAGAGCAGCTTCGTGTCCATGGAGGAGAGCAAGCAGAAGTTGGTGCCC= ATCATGACCATCTTGTCTGGAGGAGCTAAATGCCCTCAGGCCGCTGCACTCTGCCCATTTGATGAGTCCAACACCA= TCCACTTGAAGGTGATTGAGCAGCGGCCAGACCTCCGGTGGGCCAGGAGTATGATGTACCTGTCTTTACCAA= AGACAAGGAGGATTTCTTCAACTCACAGTGGGACCTCACTACACAACATATCCTGCCCTACATTGATGGGGTT= CCGC</p>
2	<p>MPS323g24.p1.abi_1 TRIM46 ok 1</p> <p>CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCAC= GCGTCCGGGCTGCCCTGTCTGTGGCTGTGACCGGCTGCTGACCGGCTGCCACCTGAGTGTGGATGTGGTCC= TGGCGCAGCTGGCTGTGACCCATGGTCGCAGCTACTGGGCTGCGCCGTAGACCCAGCCTCCTACTTGGTCAA= GGTGGGCGTCGGGCTGGAGAGCAAGCTTCAAGAAAGTTTCCAGGGTGCCCCCGATGTGATCAGCCCCAGGTAC= GACCCGGACAGCGGGCACGACAGCGGTGCCGAGGATGCCACAGTGGAGGCGTCGCCACCCCTTCGCTTTCTCAA= CCATTGGCATGGGCAAGATCCTGTCTGGGGTGGGGGCAAGCTCAAACGCAGGGCTGACAGGGAGGGATGGCCC= CACAGCCGCTGACAGTGCCCTGCCACCCCGCTGGGCATCTGCCTGGACTATGAGCGGAGCCGGGTTTCC= TTCTTGGATGCTGTTTCTTCCGTGGGCTCTTGGAGTGGCCCTGGACTGCTCAGGGCCTGTGTGCCCTGCCT= TTTGCTTATCGGGGGTGGCGCATTACAGCTCCAGGAGCCAGTGGGCACTAAGCCTGAGAGGAAAGTACCAT= TGGGGGCTTCGCCAAGCTGGACTGACCCCTCCAGGCCCC</p>
3	<p>MPS320121.p1.abi_1 ok</p> <p>CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGCTCCG= TGACCTTGAGATACCTCATCATATCACACAAAGAGATGCAGATAGAATTTGAGCATACTGATGAACAGTT= ACACCTATTTGCGGTTTCCACCGTGCACATTATGAAGAAAAGAAATGGAGGTGGGAGTTTAAATAACTATTC= TCCTCCATTCCATCGACTCCCAGCACCAGCCAGGAGGACCCCTCAGTTCAGTGTTCTCTCCACTGCCAACACAC= CCACGCCGCTTTGCAAGCGGTCCATGCGCTGGTCCAACCTGTTTACATCTGAGAAAGGGAGTGACCCAGACAA= AGAGAGGAAAGCCCCGGAGAATCATGCTGACACCATCGGGAGCGGTAGAGCCATCCCCATTAAACAGGGCATG= CTCTTAAAGCGAAGTGGGAAATGGCTGAAGACATGGAAAAAGAAATACGTCACCCGTGTGTTCCAATGGCATGC= TCACCTATTATTCAAGCTTAGGTGATTATATGAAGAATATTATAAAAAAGAGATTGACCTTCAGACATCTAC= CATCAAAGTCCCAGGAAAGTGGCCATCCCTAGCCACATCGGCCTGCACACCCATCTCCAGCTCTAAAGCAAT= GGCTATCCAAGGACATGGACACCGGGCTGGGTGACTCCATATGCTTACGCCCCAGTATCTCCAGCACCACCA= GCCCCAA</p>
4	<p>MPS320n12.p1.abi_1 ZFP95 ok</p> <p>CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGC= GTCCGCAGACATGGAATATCTGGA AAAACCCAAAGAAATGTTTCTCAAGTTCAAGATTTTGGAGAAGGCTGT= GAGTTTCAAGGCAAGCTGGATAGAAAGCAGGGAATTTCCATGAAAGAGATACTAGGACAACCATCTTCAAAGA= GGATGAATACAGTGAAGTCCCATATGTCCACAAAAAATCCTCCACTGGAGAGAGACCACATAAATGTAACGA= GTGTGGGAAAAGCTTCATTCAGAGTGCACATCTTATTCAACATCAAAGAATACACACTGGGGAGAAACCATTC= AGGTGTGAGGAATGTGGGAAAAGCTACAACCAACGCGTGCACCTAACTCAGCATCAGCGCGTCCACACAGGTG= AGAAGCCCTACACCTGTCCCTTATGTGGGAAAGCCTTCAGAGTGAGGTCCACCTTGTTTCAGCATCAGAGCGT= GCACAGTGGGGAGAGACCCCTTCAAGTGTAACGAATGTGGGAAAGGCTTTGGGAGGCGTTCCACCTGGCTGGA= CATCTTCGACTCCACTCCGAGAGAAATCCCATCAGTGTGCTGTAATGTGGGAAATCTTTTTCAGTACGTTA= GCCTAATTGAACATCAGGTGCTCCACATGGGTGAGAAAAATGAAAAAATGGCATCTGTGAGGAAGCATATAG= TTGGAACCTTGACAGTGATTGAAGACAAGAAGATTGAGTTACAAGAGCAGCCTTATCAGTGTGATATCTGTGGA= AAAGCCTTTGGTTATAGCT</p>
5	<p>MPS320n18.p1.abi_1 PRKCI ok</p> <p>CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGC= GTCCGATGCAATGAAAGTTGTGAAAAAGAGCTTGTAAATGATGATGAGGATATTGATTGGGTACAGACAGAG= AAGCATGTGTTTGAGCAGGCATCCAATCATCCTTTCCTTGTGGGCTGCATTCTTGCTTTCAGACAGAAAGCA= GATTGTTCTTTGTTATAGAGTATGTAATGGAGGAGACCTAATGTTTCATATGCAGCGACAAAGAAAACTTCC= TGAAGAACATGCCAGATTTACTCTGCAGAAATCAGTCTAGCATTAATTTATCTTCATGAGCGAGGGATAATT= TATAGAGATTTGAAACTGGACAATGTATTACTGGACTCTGAAGGCCACATTAACTCACTGACTACGGCATGT= GTAAGGAAGGATTACGGCCAGGAGATACAAACAGCACTTCTGTGGTACTCCTAATTACATTGCTCCTGAAAT= TTTAAGAGGAGAAGATTATGGTTTCAGTGTGACTGGTGGGCTCTTGGAGTGCTCATGTTTGAGATGATGGCA= GGAAGGTCTCCATTGATATTGTTGGGAGCTCCGATAACCCTGACCAGAACACAGAGGATTATCTTCTCCAAG=</p>

	TTATTTTGGAAAAACAAATTCGCATACCACGTTCTCTGTCTGTAAAAGCTGCAAGTGTTCTGAAGAGCTCTCT=TAATAAGGACCCTAAGGAACGATTGGGTTGTCTCCTCAAACAGGATTTGCTGATATTCAGGGACACCCGTTCT=TTCC
6	MPS320f05.p1.abi_1 GLB1 ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGCG= TCCGATGGAGGGCCAGTTATAACAGTGCAGGTTGAAAAATGAATATGGCAGCTACTTTGCCTGTGATTTTGACT=ACCTGCGCTTCTCTGAGAGCGCTTTCCGCCACCATCTGGGGGATGATGTGGTTCTGTTTACCAGTATGGAGC=ACATAAAACATTCTCTGAAATGTGGGGCCCTGCAGGGCTCTACACCACGGTGGACTTTGGAACAGGCAGCAAC=ATCACAGATGCTTTCTTAAGCCAGAGGAAGTGTGAGCCCAAAGGACCCCTTGATCAATTCTGAATTCTATACTG=GCTGGCTAGATCACTGGGGCCAACTCACTCCACAATCAAGACCGAAGCAGTGGCTTCCCTCCCTCTATGATAT=ACTTGCCCGTGGGGCGAGTGTGAACCTTGTACATGTTTATAGGTGGGACCAATTCTGCCTATTGGAATGGGGCC=AACTCACCTATGCAGCACAGCCCACAGCTACGACTATGATGCCCCACTGAGTGAGGCT
7	MPS321c17.p1.abi_1 ADAMTS10 ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCAC= GCGTCCGAGGAAGGGAGGGGGCGAGCCTGAGCGGGCACCTCGGGCCCGCAGGAGGTCTGCAGCGAGCTGTGGT=GTCTGAGCAAGAGCAACCGGTGCATCACCAACAGCATCCCGGCCCGCAGGGCACGCTGTGCCAGACGCACAC=CATCGACAAGGGGTGGTGTACAAACGGGTCTGTGTCCCTTTGGGTTCGGCCCGCAGAGGTGTGGACGGAGCC=TTGGGGGCGGTGACTCCATGGGGCGACTCGAGCCGACCTGTGGCGGCGCGCTGTCTCTTCTAGCCGTCACT=GGACAGCCCCAGGCCAACCATCGGGGCAAGTACTGTCTGGGTGAGAGAAGCGGCACCGCTCTGTCAACAC=GGATGACTGTCCCTGGTCCCAGGACTTCAGAGAAGTGCAGTGTCTGAATTTGACAGCATCCCTTTCCGT=GGGAAATTTACAAAGTGGAAAACGTACCGGGGAGGGGGCGTGAAGGCCTGCTCGCTCACGTGCCTAGCGGAAG=GCTTCAACTTCTACACGGAGAGGGCGGCAGCCGTGGTGGACGGGACACCTGCCGTCCAGACACGGTGGACAT=TTGCGTCAGTGGCGAATGCAAGCACGTGGGCTGCGACCGAGTCTGGGCTCCGACCTGCGGGAGGACAAGTGC=CGAGTGTGTG
8	MPS321i09.p1.abi_1 NIPA ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGCG= TCCGAGATGGCGGCGCCCTGTGAGGGACAAAGCGTTTGCCGTAGGGGTTGAAAAGAAATTGGGGTGCAGTAGTTC=GTCCCCAGAAAGGACCCCCAGAAAATCCGGCAGCTGATAGATGAGGGGATTGCCCGGAAGAGGGAGGCGT=GGACGCGAAGGACACGTCTGCCACATCCAGTCAGTTAATGGATCACCCCAAGCGGAACAACCTTCATTGGAA=TCTACAAGCAAAGAAGCCTTCTTTAGCAGAGTGGAAACATTTTCTATATCCTTTTTTAGTTCATGTGAATTGC=ACTTCTGCCTGCTTCTAGAATTCTCCAGATAAGCAACGATGTGCTGAGCTGAAGAAAGCCTTGTGTACTG=CCCATGAGAAGTTCTGTTTCTGGCCAGACAGCCCATCCCCAGACCGATTGGGATGTTGCCCTGGATGAGCC=TGCTATTCTTGTTAGTGAATTCCTAGATCGATTTCAAAGCCTTTGTCACTTGGACCTCCAGCTTCCCTTCCCTA=AGGCCGGAGGACTTGAAAACATATGTGCTTGACAGAAGACAAGATCAGTCTTCTCTACACTTGCTTGAAGATG=AACTTGATCACCGAACTGAT
10	MPS323109.p1.abi_1 COL4A5 ok 1 CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCAC= GCGTCCGCAACATCAATAATGTTTGCAACTTTGCTTCAAGAAATGACTATTCTTACTGGCTCTCTACCCAG=AGCCCATGCCAATGAGCATGCAACCCCTAAAGGGCCAGAGCATCCAGCCATTCTATTAGTCGATGTGCAGTATG=TGAAGCTCCAGCTGTGGTGTGTCAGTTCACAGTCAGACGATCCAGATTCCCATTTGTCTCAGGGATGGGAT=TCTCTGTGGATTGGTTATTCCTTCATGATGCATACAAGTGCAGGGGCGAGAAGGCTCAGGTCAAGCCCTAGCCT=CCCTGGTTCTCTGCTTGGAAAGTTCGTTTCAGCTCCCTTCATCGAATGTCATGGGAGGGGTACCTGTAACCTA=CTATGCCAACTCCTACAGCTTTTGGCTGGCAACTGTAGATGTGTGACAGATGTTTCAGTAAACCTCAGTCAGAA=ACGCTGAAAGCAGGAGACTTGAGGACACGAATTAGCCGATGTCAAGTGTGCATGAAGAGGACATAACATTTTG=AAGAATTCCTTTTCGTGTTTTAAATGTGATATATATATATAAAATTCCTAGGATGCAGTGTCTCATTGTCC=CCAACTTTACTACTGCTGCCGTCAATGGTGCTACTATATATGATCAAGATAACATGCTGACTAGTAACCATGA=AGATTGATG
11	MPS321o10.p1.abi_1 FBN3 ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGCG= TCCGGTTTCCAGTGTGAGTGCCACCTGGCTACCACCTCAGTGAGCAGACCCCGCATCTGTGAGGATATTGACG=AAATGCTCCACACACTCCAGCATCTGTGGCCCTGGCACCTGCTACAACACCTGGGGAACCTACACCTGTGTCTG=CCCTGCAGAGTACCTCCAAGTCAATGGTGGCAACAACCTGCATGGATATGAGGAAGAGTGTCTGCTTCCGGCAC=TATAACGCGCACATGTCAAATGAGCTGGCCTTCAACGTGACCCGAAAAATGTGTGCTGCTCCTACAACATTG=GCCAGGCCCTGGAATAGACCCTGTGAGGCCTGCCCCACTCCCATCAGTCTCTGACTACCAGATCCTGTGTGGAAA=TCAGGCCCCGGGATTCTCTCACTGACATCCACACGGGGAAGCCCCCTTGACATTGATGAGTGTGGGGAGATCCCC=GCCATCTGTGCCAATGGCATCTGCATAAACCAGATCGGGAGTTTCCGCTGCGAGTGCCCCGAGGCTTCAACT=ACAACAGCATCCTGCTGGCTTGTGAAGATGTGATGAGTGTGGCAGCAGGGAGAGTCCCTGCCAGCAGAAATGC=TGACTGCATCAACATCCCCGGTAGCTACCGCTGCAAGTGCACCCGAGGGTACAAACTGTGCGCCAGGCGGGGCT=TGTGTGGGACCGGAATGAGT
12	MPS321n23.p1.abi_1 ZNF235 ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACG= CGTCCGGCCAGAGGTCAAATCTTCAAGTCCATCAGATAATTCACTGGAGAGAAACCATTTAAATGTGAGGA=ATGTGGGAAAGAATTCAAGTGGAGTGTGGTCTCAGTGCCCATCAGAGGGTCCACACAGGAGAGAAACCCAT=ACGTGTCAGAGTGTGGGAAGGGCTTCACTCAGGCCTCACATTTTACACACACCCAGAGAGTCCACACTGGAG=AGAGGCCTTACATATGTGATGTCTGTTGTAAGGGCTTCACTCAGAGGTACATCTCATCTACCATCAGAGAGT=

	CCCACTGGAGGGAATCTGTAGAAATGAGAGGTGTGGTTTCAGCCTTCAGTTAGAGCTCACATCTTTGTCTCCG=TTGGGAAGTCCATGCTGATGATTGTGAAAAGTTCTTTAAAACTAGAAGCTTCAAAGAACTTTGACAGGAAAG=AAGTCTCTCAAATGCTGTGTTTGTAGACTTGGTTAGGACATGAATCTTTACAAACGTCATATTTACAGATGC=GAGAAAACTTTGTTCTGTGTAATATGATCAGTGTTTATATCAGAGTACCAGGTGTCCCGTTCTCAAGATGTAA=CACAGCAGAAAAGTCTTGTGCGAGTCTGCACAGG
13	MPS321b01.p1.abi_1 RBBP4 ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGC= GTCCGCAGCCTTCGACGACGAGTGGAAAGAACGAGTGATCAACGAGGAATACAAAAATATGAAAAAGAACC=CCTTTCTTTATGATTGGTGATGACCCATGCTCTGGAGTGGCCAGCCTAACTGCCCAGTGGCTTCCAGATG=TAACCAGACCAGAGGGGAAAGATTTCAGCATTCATCGACTTGTCTGGGGACACACACATCGGATGAACAAAA=CCATCTTGTATAGCCAGTGTGCAGCTCCCTAATGATGATGCTCAGTTTGTATGCGTCACACTACGACAGTGAG=AAAGGAGAATTTGGAGGTTTGGTTTCAGTTAGTGGAAAAATTGAAATAGAAATCAAGATCAACCATGAAGGAG=AAGTAAACAGGGCCCGTTATATGCCCCAGAACCCTTGTATCATCGCAACAAAGACTCCTTCCAGTGATGTTCT=GTCTTTTACTATACAAAACATCCTTCTAAACCAGATCCTTCTGGAGAGTGCAACCCAGACTTGCCTCTCCGT=GGACATCAGAAGGAAGGCTATGGGCTTTCTTGAACCCAAATCTCAGTGGGCACTTACTTAGTGCTTCAGATG=ACCATACCATCTGCTGTGGGACATCAGTGCCGTTCCAAAGGAGGGAAGTGGTAGATGCGAAGACCATCTT=TACAGGGCATAACGGCAGTAG
14	MPS321b06.p1.abi_1 TUBA1 ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGC= GTCCGAAGCACAACTCTCCTCTCTCGTCTCCGCCATCAGCTCGGCAGTCGCGAAGCAGCAACCATGCGTGAGT=GCATCTCCATCCACGTTGGCCAGGCTGGTGTCAGATTGGCAATGCCTGCTGGGAGCTCTACTGCCTGGAACA=CGGCATCCAGCCCGATGGCCAGATGCCAAGTGACAAGACCATTTGGGGGAGGAGATGATTCTTCAACACCTTC=TTCACTGAGACGGGGCTGGCAAGCATGTGCCCCGGGCAGTGTTGTAGACTTGAACCCACAGTCATTGATG=AAGTTCGCACTGGCACCTACCGCCAGCTCTTCCACCCTGAGCACTTATCACAGGCAAGAAAGATGCTGCCAA=TAATATGCCCCAGGGCACTACACCATTGGCAAGGAGATCATTGACCTCGTGTTGGACCGAATTTCGAAGCTG=GCCGACCAGTGCACGGGTCTCCAGGGCTTCTTGGTTTTCCACAGCTTTGGTGGGGGAAGTGGTTCTGGGTTCA=CCTCGCTGCTCATGGAACGTCTCTCAGTTGATTATGGCAAGAAGTCCAAGCTGGAGTTCTCTATTTACCCGGC=GCC
15	MPS321c09.p1.abi_1 MCM3AP ok 3 CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCAC=GCCTCCGGTCTCCACAGTCTCTACCAGCCCTGCGCCCTCACCAGTGCCTCTGCCTCCTGTCTGGCACTGA=CCCCGTCTGTGGGCGCCAGCCTCTTCCAGCTGTCTGTGCAGCCTGAACCACCGCCTCCAGAGCCGTGCCAT=GTACTCTGACGAGGACCTGGCGCAGGTGGTGGACGAGCTCATCCAGGAGGCCCTGCAGAGGGACTGTGAGGAA=GTGGCTCTGCGGGTGCTGCCTACGCAGCTGCCGCCCTGGGTGTTTCTAATGCTGCTATGGAGGATTGTGTAA=CAGCTGCAACCAACCGGCATTTTGAGGCACATTGCAGCTGAAGAAGTGCTAAGGAAAGAGAGCGAAGGGAGCA=GGAGAGGCAGCGGGCTGAAGAGGAAAGGTTGAAACAAGAGAGAGAGCTGGTGTTAAGTGAGCTGAGCCAGGGC=CTGGCCCTGGAGCTGATGGAACGCGTGATGATGGAGTTTGTGAGGGAACCTGCTCCAGGAGTTGAAGAATG=CAGTAGAGACAGACCAGAGGGTCCGTGTGGCCCGTTGCTGTGAGGATGTCTGTGCCCACTTAGTGGACTTGT=TCTCGTGGAGAAATCTTCCAGACT
16	MPS321k18.p1.abi_1 FLJ14888 ok CGGATCCTATTTAGGTGACACTATATAATC GGCAGCCAC=GCCTCCGTGGATCCTGGGGACGACTGGCTGGTGGAATCCTTGCGCTTGTAACAGGATTTCTATGCATTCGACC=GTGCAGGAGCCACTCGAGTCTTGAATGGATTGATGACAAAGGAGTCTTTGTTGCTGGCTATGAAAGCCTGAA=AAAGAATGAAATTTCTTCTGTAATTAACCTCTCAGACTTTCTGTAAAGGAAAAACAAGGCTTATTTCCAGAA=AGAGATTTCAAAGTGCGCCATGGAGGATTTTCAGACAGGTCTATCTTTGATCTAAAGCATGTGCCACATACCA=GATTGCTGGTTACAGTGCCCTTCCAGGTTGTTATCTGCAGGTGTGGCAGGTTGCAGAGGACAGTGATGTCAT=TAAAGCTGTGAGCACCATTGCTGTGCATGAGAAAGAGGAGAGTCTCTGGCCTAGGGTGGCCGTCTTCTCCACA=TTGGCACCCGGAGTCTTCCATGGGGCGAGGCTCCGAAGTCTGCAGGTCTGTTGATCTGGAGTCCCGGAAGACCA=CGTACACCTCAGATGTGAGTGACAGTGAGGAGCTGAGTAGCCTGCAGGTCTTAGATGCAGACACCTTTGCCTT=CTGCTGTGCTTCAAGCCGCTGGGCTTGTGTGACACCCGCGCAGAGTGGGCACCGTTGGAGAATCGCAGCCCT=GGCCCTGGGTCTGGTG
18	410a_ "prey" PTN ok 72 CGGCCGCGTTCGACTTGAGTCAAAGGCAGGATCAGGTTCCCCGCTTCCAGTC=CAAAAAATCCCGCCAAGAGAGCCCCAGAGCAGAGGAAAAATCCAAAGTGAGAGAGGGGAAGAAAGAGACCAGTG=AGTCATCCGTCCAGAAGGCGGGGAGAGCAGCAGCGGCCCAAGCAGGAGCTGCAGCGAGCCGGGTACCTGGACT=CAGCGGTAGCAACCTCGCCCTTGTCAACAAAGGCAGACTGAGCGCCAGAGAGGACGTTTCCAACCAAAAAATG=CAGGCTCAACAGTTCCAGGCTGGGGAGAAATGTGACCTGAACACAGCCCTGAAGACCAGAACTGGAAGTCTGAA=CTGTGGATACTGCTGAAGCAGGGAAGAAAGAGAAACAGAAAAAAAGTGAAGAAGTCTGACTGTGGAGAATG=GCAGTGGAGTGTGTGTGCCACCAGTGAGAGCTGTGGGCTGGGCACACGGGAGGGCACTCGGACTGGAGCT=GAGTGCAAGCAAACCATGAAGACCCAGAGATGTAAGATCCCCTGCAACTGGAAGAAGCAATTTGGCGCGGAGT=GCAAATACAGTTCCAGGCTGGGGAGAAATGTGACCTGAACACAGCCCTGAAGACCAGAACTGGAAGTCTGAA=GCGAGCCCTGCACAATGCCGAATGCCAGAAGACTGTCAACATCTCCAAGCCCTGTGGCAAACCTGACCAAGCCC=AAACCTCAAGCAGAACTAAGAAGAAGAAAAAGGAAGGCAAGAAACAGGAGAAGATGTGGATTAAAGATGT=CACCTGTGGAACATAAAAAAGGACATCAGCAAAACAGGATCAGTTAACTATTGCATTTATATGTACCGTAGGCTT=GTATTCAAAAATTATCTATAGCTAAGTACCCAATAAGCAAAAAACAAAAAGAAAAATTTTGTAGTAGC=

	<p> GTTTTTTAAATGTATACTATAGTACCAGTAGGGGCTTATAATAAAGGACTGTAATCTTATTTAGGAAGTTGAC= TTATAGTACATGATAAATGATAGACAATTGAGGTAAGTTTTTTGAATTTATGTGACATTTTACATTTAAATTTT= TTTTACATTTTTTTGGGCAGCAATTTAAATGTTATGACTATGTAACTACTTCTCTTGTGTAGGTAATTTTTTTC= ACCTAGATTTTTTTTCCCAATTGAGAAAAATATATACTAAACAAAATAGCAATAAAACATAATCCCTCTATTTA= CAAAAAAAAAAAAAAAAA </p>
19 = 17	<p> MPS19c21.p1.abi_1 C16orf34 ok 3 CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCAC= GCGTCCGGCGCCGGCTCCAGGGCCATGAAGCCCCAGGAGGAGAATCGAGCAATCTTTTTGGAAGTCCAGAAG= AAGCTACTCCTTCCAGCAGGCCTAATAGGATGGCATCTAATATTTTGGACCAACAGAAGAACCCTCAGAACAT= ACCCAAGAGGACAAATCCCCAGGGGTAAGGAAGTGGTATCTTTGACGAATCAACCCCCGTGCAGACTCGA= CAGCACCTGAACCCACCTGGAGGGAAGACCAGCGACATTTTGGGTCTCCGGTCACTGCCACTTCACGCTTGG= CACACCCAAACAAACCAAGGATCATGTTTTCTTATGTGAAGGAGAAGAACCAAAATCGGATCTTAAAGCTGC= AAGGAGCATCCCGGCTGGAGCAGAGCCAGGTGAGAAAGGCAGCGCCAGAAAAGCAGGCCCGCCAGGAGCAG= GAGCCCATGCCACAGTCGACAGCCATGAGCCCCGGCTGGGGCCGCGGCTCGCTCTCACAACAAGGTCCTGA= ACCCACCAGGAGGCAATCCAGCATC </p>
20	<p> MPS35j10.p1.abi_2 APOA1 ok 4 CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGC= GTCCGCCACGCGTCCGCCACGCGTCCGCTTGACAACCTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCAGCAAGCTGCG= CGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGACGCAGGAG= ATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAACCCTACCTGGACGACTTCAGAGAAGTGGCAGG= AGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAGAGGGCGCGGCCAGAACT= GCACGAGCTGCAAGAAAGCTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCCCATGTGGACGCG= CTGCGCACGACATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGG= AGAACGGCGGCGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGGC= CAAGCCCGCGCTCGAGGACCTTCGACAAGGCCTGCTGCCCGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGC= GCTCTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCA </p>
21	<p> 189a_ "prey" SMT3H1 ok CGGCCGCGTTCGACCGGCCCCGCGCACAGTTGCGGCGGGAGAGCGGCGGGC= CGAGAGCGTGACTCGCCCCGCTCCGCGCTGCTTCCCCCGCGCCCTCCCCGCGCCGCTCGCGCAGCCATGTCC= GAGGAGAAAGCCCAAGGAGGGTGTGAAGACAGAGAATGACCACATCAACCTGAAGGTGGCCGGGCAGGACGGCT= CCGTGGTGCAGTTCAAGATCAAGAGGCACACGCCGCTGAGCAAGCTGATGAAGGCCTACTGCGAGAGGCAGGG= TTGTCAATGAGGCAGATCAGATTCAAGTTTCGACGGGCAGCCAAATCAATGAAACTGACACTCCAGCACAGCTG= GAGATGGAGGACGAGGACACCATCGACGTGTTCCAGCAGCAGACGGGAGGTGTGCCGAGAGCAGCCTGGCAG= GGCACAGTTTCTAGAGGGCCGCTCCCCAGCCCCGGCCGCTCCATCCTCGCATTTGCTGTTGAATGGTGAGCAGT= GACCATGCCGACCACAAAGGTGTCTGCGGAACTCGAGGACATTCACCACGATGATTTTCTCTCTTTGATGT= ACTTCAAGTGCAACTCAAAACTATATCTCGAGGATGAATCTGTAACCTTAAATTGGGCCAATCAGAATTGTA= TCTTTGTTTCAGGTAATAAGTGTGCAAGATATTGTGGGTACTTTTGTGTGCTCATTTGTGTTTTCCCCCCTC= CTACAACATTTTTTTAACCCCAAAATTATAGCCTGAATGTTGCTTTTAGTCTGCGCAGGATAATACTCCTA= GTGTAGTGCC </p>
22	<p> 116a_ "prey" ECH1 ok 6 CGGCCGCGTTCGACGTGGACCTTGTACCGCCTGTGACATCCGGTACTGTGCC= CAGGATGCTTTCTTCCAGGTGAAGGAGGTGGACGTGGGTTTGGCTGCCGATGTAGGAACACTGCAGCGCCTGC= CCAAGGTATCGGGAACACAGAGCTGGTCAACGAGCTGGCCTTCAACGCCCGCAAGATGATGGCTGACAGGGC= CCTGGGCAGTGGGCTGGTCAGCCGGGTGTTCCAGACAAAGAGGTCATGCTGGATGCTGCCTTAGCGCTGGCG= GCGGAGATTTCCAGCAAGAGCCCCGTGGCGGTGCAGAGCACCAAGGTCAACCTGCTGTATTCGCCGACCAATT= CGGTGGCCGAGAGCCTCAACTACGTGGCGTCTTGAACATGAGCATGCTGCAGACCCAAGACCTCGTGAAGTC= GGTCCAGGCCACGACTGAGAACAAGGAAGTGAAGAACCGTCACCTTCTCCAAGCTCTGAGAGCCCTCGCGTCCC= AGGCCCCAGCCAGGGGGCCGGCCTTGTCCCGCCTCATCCACAGAAAGGAGGATGGGCGATGACAGTTGTTTC= TATGCCTTCTGACCCAGTTTCCAGTTTATAACTTTATGACAATGAGTTTCTCAAGCCCAAGGCCTTATCTTC= ACCCCACAAACAATAAAGCAAAGTAAAGAAAAA </p>
23	<p> 361b_ "prey" UNC119 ok 73 CGGCCGCGTTCGACGGGACGGCGACGAGTCCGCTCCGGGGCCCTCGGGC= CAGAGCGTGGCCCCATACACAGCCGCTGCGGAATCCGAATCTGGGTCCGAGTCGGAGCCGGACGACGAGGCC= CAGGGCCAGGCGGGGCGCTGCAGAGGAAGCAGCCGATCGGGCCGAGGACGTGCTGGGGCTGCAGCGGAT= CACCGGTGACTACCTCTGCTCCCTGAGGAGAATATCTACAAGATCGACTTTGTGAGGTTTAAGATTCGGGAC= ATGGACTCAGGCACTGTCTCTTTTGAATCAAGAAGCCCCAGTCTCAGAACGGTTCGCCATCAACCGGCGGG= ACCTGGACCCCAATGCTGGGCGCTTTGTCCGCTACCAAGTTCACGCTGCTTCTCCCGCTGAGGACAGGTGGG= AGCCACGGTGGAGTTTCAAGTGGGAGACAAGCCTGTCAACAACCTCCGATGATCGAGAGGCACTACTCCGC= AACCAGCTACTCAAAAGCTTCGACTTCCACTTTGGCTTCTGCATCCCCAGCAGCAAGAACACCTGCGAGCACA= TTTACGACTTCCCCCTCTCTCCGAGGAGCTGAGTGCGCGGGCAGGGTCTTCTGGGAGTGGGGAAGTGGGGGC= GTCTAGAGACTGAGCTGCGGGAGGGAGAGGGACTTGTGGGTCTGATCCCATTTCTCCCCACCCTGGGGCTCTT= CTGTGCTGTGCACTTCCATATCATCTCGTAGAGAAAGAGGCTGGCGATATTTTCAAGGCTGTTTGGCTGTCCC= TGTACCCAGTCTGAAGCCCTGCAAGTGGCGGTACTCAAGCTCCTGCCCTTTGCCCGGTCTGGCTGGCCCTC= TCTTGCAGCCAGCGTGACGATCCCGACCCCGATGAGACCCACCCTGACAGCTCTACTTCTCTGATGACCCG= CCTGCCCCTCCCCCTCCAGCCAACCATCCCTACACCCGGGCTCCTCGACCCCGGCTCGCCCTGAACCC= CTCAGCGCCCCATTTCTCTCCCTGTTTAACTGTTGACCTTCCCTCTCTTCTCCCCCTTCATCCGCTTCTCTC= </p>

[illegible]

	CCGGTCCACTCCATACTCGGCATACGACCCAGAGACGTACACAGGCCACTGGAAGCAGCTGACTGTGCGCACC=AGCCCGCCACCAGGCCATTGGCCTACTTCCACCCC
29	MPS321m07.p1.abi_1 GNB5 ok 1 CGGATCCTATTTAGGTGACACTATAGAATC GTCGACCCACGC= GTCCGCGTGCCTCCCCGCGCGAAGATGGCAACCGAGGGGCTGCACGAGAACGAGACGCTGGCGTGCCTGAAG= AGCGAGGCCGAGAGCCTCAAGGGCAAGCTGGAGGAGGAGCGAGCCAAGCTGCACGATGTGGAGCTGCACCAGG= TGGCGAGCGGGTGGAGGCCCTGGGGCAGTTTGTTCATGAAGACCAGAAGGACCCCTCAAAGGCCACGGGAACAA= AGTCCTGTGCATGGACTGGTGCAAAGATAAGAGGAGGATCGTGAGCTCGTCACAGGATGGGAAGGTGATCGTG= TGGGATTCCTTCACCACAAACAAGGAGCACGCGGTCACCATGCCCTGCACGTGGGTGATGGCATGTGCTTATG= CCCCATCGGGATGTGCCATTGCTTGTGGTGGTTTGGATAATAAGTGTCTGTGTACCCCTTGACGTTTGACAA= AAATGAAAACATGGCTGCCAAAAAGAGTCTGTTGCTATGCACACCAACTACCTGTCGGCTGCAGCTTACC= AACTCTGACATGCAGATCTGACAGCGAGCGGCATGGCACATGTGCCCTGTGGGACGTGGAGAGCGGGCAGC= TGCTGCAGAGCTTCCACGGACATGGGGCTGACGTCCTCTGCTTGGACCTGGCCCCCTCAGAACTGGAAACAC= CTTCTGTCTGGGGATGTGACAAGAAAGCCATG
30	380b_ "prey" MDS025 ok 24 CGGCCGCGTCGACCTTATCTCTGTTACCTTCTTGAATCTTCAGTGCCA= GAGTCTTCACTACCACAAACCAAGGAGGGATATGATAGCGGCCAGTGGATATAACTCCTTTAGAACAAAGGA= AATTAACTTTTGATACCCATGCATTTGGTTCAGGACTTGGAACTCATGGATTTGACAAAACACAAGCAGAAAC= AATTGTATCAGCGTTAACTGCTTTATCAAATGTGAGCCTGGATACTATCTATAAAGAGATGGTCACTCAAGCT= CAACAGGAAATAACAGTACAACAGCTAATGGCTCATTGGATGTATCAGGAAAGACATGGTCATCCTAGAGA= AAAGTGAATTTGCAAATCTGAGAGCAGAGAATGAGGTGATACAAATTTTAATTTATTAATAAAATAAATG= ATCTCATAAATAAGCATCTACTTAAAGGAATAAGTTAATAAGACCAAGTAATAATCCATGTGGTTAGTAAACA= ATAAATTTTGTAGATTTAAACACATACTATTTGTTTAAACCATACCTAATCTTTTTCTATATAAATCATAGTGCT= TTGCATACTGAAGAGAATAAGAGTTACATTTTATACATATAAAACCACATAAAACAAAATCTTTGAGCTATAT= ATATAAAATTTGTATATAATGGTTTCAGAGCTGAGAGTAATACGGCATTTCATTTTATTTAATCCTGTACT= AAATGCTCTTTGTGACTTAAAGTATATTTCTGTAATTAAGTCAGAATTTAAGTTATGTTATCCACTATAGCT= TATTTTTAAATTTAGAAAATCAGTTTAAAAAGTATAAATAAAACAAATGCATTTTGCTCATAAGAATTAT= TTTCTGAATACAGTGGCTTACTAGTTTCTTTTGAAGATTTTTTCTTATCAATTCTGTATTAGAAATCCATA= GATTGTCCAAATTTTGGTAATCTAGGGTTTCAGATTTTTTAAATCATAATATAGACTTGGTTTAAATGCTAATT= GCATGTGATCTTTCTGTACCTAGAAAATGAAAATGAATTAGACCAAGTTAAGCAACAACTAATGGTAAGTG= AATTTTTTTCTAGCTGTAAATTCAGAACAAATATTCTGTTACAGATCATTTTTTAAATATCTTTGCTTTCT= TTAAAGCATGAAACCAAGTCGAATCAGAGCAGATAATAAACTGGATATCAACTTAGAAAGGAGCAGAGTAACAG= ATATGGTAATGTTCTTTTAAATGTACTTTCTTGGTTACTTACTCTTTTTTATTTTATAGACTTTTTTTTTAAC= TTCTGCTGCTTCATATCCTATAGTTTACAGATCAAGAAAAGCAACTTATGGAACAACTACAGAATTTCAAA= AAAGGTAAGTAATATGTAAAAATGTCTCTTTTGTGCTGCTTTGTGCTGCTTTGTATAACTGCTTTTATGTGTACC= AGTTTATAAGTTTAGACTTTTAAAACTACCCTTGTAGAGTCTCTGGCTTCTCATAGCTATTATAGTTAAACC= AGCACTTTTGGGGAACCTGGCACCAGGTAGATGGTCGCCCATGAGCCATGCCCTTGAAGTAAGAATCAAGATT= TCCACATAGTGTCTTTTTTAACTAAATTAATCTATATAAGAAAATAACTATTTTTTGGGCCAGGCACAGT= AGCTCACACCTGTTAATCCTGCATTTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGTTCAAGACCAGTCTGGGCAACATAGCAA= GACCCTTCTCAATATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
31	ET_293 FALZ ok CCCTCTCATGGATAAATGTCATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAA= CCCAAAAAAGAGATCTC GTCGACGAAAAAAGCAGGCTGTAGGGTTTGTACAAAACCTTGGGGATTTGCTTTG= CTGTGAGACATGTTTCAGCAGTATACCATTTGGAATGTGTGAAGCCACCTCTTGAGGAGGTGCCAGAGGACGAG= TGGCAGTGTGAAGTCTGTGTAGCACACAAGGTGCCTGGTGTGACTGACTGTGTTGCTGAAATCCAAAAAATA= AACCATATATTCCGACATGAACCTATTGGATATGATAGAAGTCGGAGGAAATACTGGTTCTTGAACCGAAGACT= CATAATAGAAGAAGATACAGAAAATGAAAATGAAAAGAAAATTTGGTATTACAGCACAAAGGTCCAACCTTGCA= GAATTAATTGACTGTCTAGACAAAAGATTATTGGGAAGCAGAACTCTGCCAAATCTAGAAGAAATGCGTGAAG= AAATTCACCGACACATGGACATTACTGAAGACCTGGCCAATAAGGCTCGGGGGAGTAACCAATTTCTTTTTGTC= GGCAGCTAATGAGGAAATTTTGAATCCATTAAAGAGCCAAAAAGGGGAGACATTGATTATGTAAAAGGCCCA= GAAGAAACCCCAAGACAAGAATGGGGCCTTAAATGTACTTTAAAGATGCTGTGGAAAAACAGAGTAAGAA= TTTGCAGGCCACGTCCTTAAACCCACACTGTGCGCGCCGACGATCTATTAAATTTGTCAGATACCTTGAAAAA= CCCCCGAGGTGTACTTTAACTCGGTGCATTGGGCCG
32	ET_295 SP110 ok 1 AGTGACACTGTGGATTTTCACTGTTCTAAGCTCCCCGTGACCTGTGGTGAGGCGA= AAGGGATTTTATATAAGAAGAAAAATGAAACACGATCCTCAGTGAAGTGCATTTCGGAATGAGGATGGAACCTG= GTTAACACCAAAATGAATTTGAAGTCGAAGGAAAAAGGAAGCAACGAAAGAACTGGAAACGGAATATACGTTGT= GAAGGAACGACCTTAGGAGAGCTGCTGAAGCGGAAAACTCGGATGAATGCGAGGTGTGCTGTCAAGGGGGAC= AACTTCTCTGCTGCGGTACTTGTCCACGAGTCTTCCATGAGGACTGTCACATCCCCCTGTGGAAGCCAAGAG= GATGCTGTGGAGTTGCACCTTCTGTAGGATGAAGAGGTCTTCAGGAAGCCAAACAGTGCCATCATGTATCTAAG= ACCCTGGAGAGGCAGATGCAGCCTCAGGACCAGCTGAAATGTGAGTTTCTTCTTGAAGGCCTACTGTCTATC= CACAAAGCTTCTTTTACGGGCATCCCATTTAATATTCCGAGAATACGGTGAGCCCTTTTCAAGAAAGCAATGTG= GTTTGGACCTTGGTTAAGGAAAGGCTGATTACCGAAATGTACACCGGNGGCATGGTTTGTGCGAGAAAAATGCN= CCTTGGTGGTTTCCAAACCATAAAACATTTTACAAGGNTTTTACTTTTGGCCAGGTAGGACTTGACTTAAANG= CAGAACCTTTGAAAAAGANTTTCAAAAACCTCTTCGGTTAGGANCCACTTTGAGCGGCCCNNAATTTTTTAAAT= GTANATTCTGAAAAACCCCAAGTN
33	ET_479 CDH23 ok

	<p>GTGCTGATACACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATA= CCCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTC GTCGACGAAAAAAGCAGGCGTCAACGTGCGGGACGTCAATGACG= GATACGCCCCAGTTCAAGCCCTTTGGGATCACCTACTACATGGAGCGGATCCTGGAGGGGGCCACCCCTGGGA= CCACACTCATTGCTGTGGCAGCCGTGGACCTGACAAGGGCCCTTAATGGGCTGGTCACCTACACCTGCTGGA= CCTGGTGCCCCCAGGGTATGTCCAGCTGGAGGACTCCTCGGCAGGGAAGGTCATTGCCAACCGGACAGTGGAC= TACGAGGAGGTGCACTGGCTCAACTTTACCGTGAGGGCCTCAGACAACGGGTCCCGCCCCGGGAGCTGAGA= TCCTGTCTACCTGGAAATCGTGGACATCAATGACAACAACCCCATCTTTGACCAGCCCTCCTACCAGGAGGC= TGTCTTTGAAGATGTGCCTGTGGGCACAATCATCTGACAGTCACTGCCACTGATGCTGACTCAGGCAACTTT= GCACTCATTGAGTACAGCCTTGGAGATGGAGAGAGCAAGTTTGCCATCAACCCACCACGGGTGACATCTATG= TGCTGTCTTCTCTGGACCGGGAGAAGAAGGACCCTATATCCTGACTGCCCTGGCCAAAGACAACCCCTTGGGG= ATGTAGCCAGCAACCGTCGCGAAAATTCAGTGCAAGGTGGTGAACCAAGTGTCTGGATGTAAATGACTGCCGGCC= ACAGTTTTTCAAGCCTAGTTCAGCACAAGCGTGTATGAGAATGAGTCCGCGGGCACCTCGGTAATCACCATAA= GGGCCACTGACCAGGATGGAGGGTCCAAGGGAGAGGTGACCCACTTACTTGG</p>
34	<p>ET_82 CHRNA4 ok CCTACAAATGGATGATGTGTATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATAACCCACCAA= ACCCAAAAAATGTTATCTC GTCGACGAAAAAAGCAGGCAGCAGCCATGTGGAGACCCGGGCCCCACGCCGAGG= AGCGGCTCCTGAAGAACTCTTCTCCGGTTACAACAAGTGGTCCCGACCCGTGGCCAACATCTCGGACGTGGT= CCTCGTCCGCTTCGGCCTGTCCATCGCTCAGCTCATTGACGTGGATGAGAAGAACCAGATGATGACCACGAAC= GTATGGGTGAAGCAGGAGTGGCAGCACTACAAGCTGCGCTGGGACCCAGCTGACTATGAGAATGTACCTCCA= TCCGCATCCCTCCGAGCTCATCTGGCGGCCGGACATCGTCTCTACAACAATGCTGACGGGGACTTCGCGGT= CACCCACTGACCAAGGCCACCTGTTCCATGACGGGCGGGTGCAGTGGGCTCCCCGGCCATTTACAAGAGC= TCCTGCAGCATCGACGTACCTTCTTCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACCATGAAATTCGGCTCCTGGACCT= TCGACAAGGCCAAGATCGACCTGGTGAACATGCACAGCCGCGTGGACCAACTGGACTTCTGGGAGAGTGGCGA= GTGGGTCTCGTGGACGCCGTGGGCACCTACAACACCCGGAATACGAGTGTCTGCGCCGAGATCTACCCGGAC= ATCAACTATGCGCTTGTCAATCGCGGGTGCCCGTCTTCTTACCATTAACTAAGACCCACCTTGAGCGGGCC= GCGATTTATGAATCG</p>
35	<p>ET_47 CKN1 ok 1 TGTCTGATAGTCTTCGTGAGCCGAGCTGCACCATTGAAGGGCTGGCGGATGGGGTTAT= TCGCAACGGCGACTGGCTGGAATTCAT GTCGACGAAAAAAGCAGGCGACAGAGATGTTGAAAGAATCCACGG= CGGTGGAATTAACCCCTTGACATTGAACCTGTTGAAGGGAGATACATGTTATCAGGTGGTTGAGATGGTGTG= ATTGTACTTTATGACCTTGAGAACTCCAGCAGACAATCTTATTACACATGTAAAGCAGTGTGTTCCATTGGCA= GAGATCATCCTGATGTTTACAGATACAGTGTGGAGACTGTACAGTGGTATCCTCATGACACTGGCATGTTTAC= ATCAAGCTCATTTGATAAACTCTGAAAGTATGGGATACAAATACATTACAAACTGCAGATGTATTTAATTTT= GAGGAAACAGTTTACAGTCATCATATGTCTCCAGTCTCCACCAAGCACTGTTTGGTAGCAGTTGGTACTAGAG= GACCCAAAGTACAACCTTTGTGACTTGAAGTCTGGATCCTGTTCTTCACTTACAGGGTCACAGACAAGAAAT= ATTAGCAGTTTTCTGGTCTTACGTTATGACTATATTCTGGCAACAGCAAGTGTGACAGTAGAGTAAATTA= TGGGATGTGAGAAGAGCATCAGGATGTTTGATTACTCTTGATCACCATATTCGCAAAAGAGTACAGCTGTTT= GAATAGCCAACACTGTTTCAATATGGGAAAGGTATTGCTTATTGTTTACAGATGATGGACTAACCTCCTCCTGG= TGGACCAATAATCGAAGAGGGTTGGAATAGTTTCATGGAGAAACCACTTGGT</p>
36	<p>ET_158 MASP1 ok TAANTCCNTNNAATANNTTCATGATGTATATAACTATCTATTCCATGATGAAGATA= CCCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTC GTCGACGAAAAAAGCAGGCCACACCGTGGAGCTAAACAATATGT= TTGGCCAGATCCAGTCGCTGGTTATCCAGACTCCTATCCAGTGATTGAGAGTGACTTGGAAATATCACTGT= CCCAGATGGGTTTCGGATCAAGCTTTACTTCATGCACCTCAACTTGGAAATCCTCCTACCTTTGTGAATATGAC= TATGTGAAGGTAGAACTGAGGACCAGGTGCTGGCAACCTTCTGTGGCAGGGAGACCACAGACACAGAGCAGA= CTCCCGGCCAGGAGGTGGTCTCTCCCTGGCTCCTTCATGTCCATCACTTTCGGGTGAGATTTCTCCAATGA= GGAGCGTTTACAGGCTTTGATGCCCACTACATGGCTGTGGATGTGGACGAGTGAAGGAGAGGGAGGACGAG= GAGCTGTCTGTGACCACTACTGCCACAACCTACATTGGCGGCTACTACTGCTCCTGCCGCTTCGGCTACATCC= TCCACACAGACAACAGGACCTGCCGAGTGGAGTGCAGTGACAACCTCTTCACTCAAAGGACTGGGGTGATCAC= CAGCCCTGACTTTCCAAACCCTTACCCCAAGAGCTCTGAATGCCTGTATACCATCGAGCTGGAGGAGGGTTTC= ATGGTCAACCCCTGCATTTGAGGACATATTGACATTGAGGACCCATCTGAGGTGCCCTGCCCTATTACTACA= TCAAGATCAAAGTTGGTCCAAAGGTTTGGGCCCTTTCTGTGGAGAGAAAGCCTCAAACCCATCAGCACCCA= GAGCCACAGAGCCCTTGATCTTGGTTTCAATATGACAAACTCGGAGGAGAACCAGGGTTGGAGGTTCTCATACA= GGGCTTCAGGAATGAGTGGCCCAAGTTACAGCCTTCTGTGATGGGAAAATCGAGCCTCCCAAGCCAAGTTTTT= TTAAGACCAGTGT</p>

37	ET_192 NGFR ok CCCTCCAATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAA= CCCCAAAAAGAGATCTC GTCGACGAAAAAGCAGGCTTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAGCAGAACAAAGCA= AGGAGCCACAGCCGGCCAGTGAACAGACGCCCCACCAGAGGGAGAAAACTCCACAGCGACAGTGGCATC= TCCGTGGACAGCCAGAGCCTGCATGACCAGCAGCCCCGCACGCAGACAGCCTCGGGCCAGGCCCTCAAGGGTG= ACGAGGCCTCTACAGCAGCCTGCCCCAGCCAAGCGGGAGGAGGTGGAGAAGCTTCTCAACGGCTCTGCGGG= GGACACCTGGCGGCACCTGGCGGGCGAGCTGGGCTACCAGCCCGAGCACATAGACTCCTTTACCCATGAGGCC= TGCCCCGTTCGCGCCCTGCTTGCAAGCTGGGCCACCCAGGACAGCGCCACACTGGACGCCCTCCTGGCCGCC= TGCGCCGCATCCAGCGAGCCGACCTCGTGGAGAGTCTGTGCAGTGAGTCTAGGACCCAGCTTGAGCGGCCGG= AGATCTATTAATCGTAAATACTGAAAAACCCGCGCAGGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATT= TCTTTATTTATTCCATCGTTTGCTTTTTTTATGTAACATATTCTTCTTTTAGGTTACATACTTGGCCATGGAA= CCTCTGGTCTTATAGAAATTTTTTAATGGCTAGAATTTAAGGCCATCTTTTTTTGGGACCTAAAATTTTCA= TGAAAAATATTTACAGGGGCTT
----	---

Tabelle 41: Sequenzen der Klone aus dem YTH-Screen Berlin.